

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

MAURICE NICOLLE (1)

1862-1932.

Quelques semaines à peine après la mort de C. Delezenne, voici que, de nouveau, l'Institut Pasteur perd, en Maurice Nicolle, un de ses membres qui l'ont le mieux servi et qui ont le plus contribué à enrichir d'excellents travaux l'œuvre pasteurienne.

Depuis douze ans, une maladie implacable l'avait écarté du laboratoire. Mais nous le gardions parmi nous pour le mieux soigner et par gratitude pour le dévouement si parfaitement désintéressé avec lequel il s'était donné tout entier, pendant trente années, à notre Maison et à la science.

Maurice Nicolle, aîné des deux frères dont le nom restera illustre dans la Science, était entré en 1894, peu de temps après l'achèvement de son internat des hôpitaux, au labora-

(1) Paroles prononcées aux obsèques de notre regretté collègue et ami à Rouen, sa ville natale.

toire de Roux comme préparateur. Après Yersin, il succédait à Haffkine. Il y apprit la technique impeccable qu'on y pratiquait alors. Il commença par s'attacher avec beaucoup d'ingéniosité à perfectionner les méthodes de colorations microbiennes, surtout en ce qui se rapporte aux organismes ciliés, et il se révéla bientôt habile expérimentateur.

Appelé en 1893, sur la demande de Chantemesse, à fonder à Constantinople — l'Istanbul de nos jours — l'Institut bactériologique ottoman, il y forma de bons élèves avec quelques-uns desquels, notamment Refik, Noury et Adil, il publia d'intéressantes recherches sur la pneumonie des chèvres d'Anatolie, sur la peste bovine, sur la malaria des bovidés, le bouton d'Alep. Déjà à cette époque il faisait la démonstration de la filtrabilité du virus de la peste bovine et de la vaccine jennérienne. Son enseignement y fut très suivi et très brillant. On en retrouve la substance et le caractère essentiellement objectif dans le livre de technique microbiologique qu'il publia en 1902 avec Remlinger et dans ses « Éléments de Microbiologie générale », datant de 1901, récemment réédités et mis à jour par A. Boquet.

Rentré de Constantinople en 1904, Maurice Nicolle s'attaqua presque simultanément à l'étude d'une foule de problèmes qui excitaient sa curiosité. Il devint alors un vrai chef d'école, groupa autour de lui des collaborateurs qui, presque tous, sont demeurés ses amis. Son esprit inventif, son imagination constamment en travail, lui faisaient concevoir sans cesse de nouveaux projets d'expériences et de nouvelles théories qui fournissaient d'ingénieuses explications des relations des antigènes et des anticorps avec l'immunité.

Le nombre des travaux qu'il a publiés seul ou avec ses collaborateurs, de 1902 à 1924, est considérable. Les principaux se rapportent à la morve expérimentale du cobaye, au gonocoque, aux pneumocoques, au bacille dysentérique de Shiga, au bacille de Schmorl, à ce qu'il a appelé les « microbes de sortie » dont le rôle est fort important et souvent nuisible dans les infections naturelles et expérimentales; au titrage *in vitro* des toxines et des antitoxines, aux sérums antimicrobiens, aux phénomènes de précipitation mutuelle des antigènes et des anticorps.

Ses recherches avec Mesnil sur la chimiothérapie des trypan-

nosomiasés et sur les couleurs de benzidine ont été particulièrement fécondes. Elles ont précédé les travaux d'Ehrlich sur ce sujet et furent le point de départ des grands progrès ultérieurement réalisés dans la lutte contre la maladie du sommeil, le Nagana et les affections dues aux protozoaires sanguicoles.

La pathologie comparée avait toujours retenu son attention. Ses idées gravitaient, disait-il, autour du principe de l'« Unicité de la Médecine ». Il les a exprimées dans son livre, écrit en collaboration avec Magrou, sous le titre : « Maladies parasitaires des plantes ». C'était en réalité un petit traité de pathologie générale, fort suggestif et plein d'idées neuves.

Maurice Nicolle avait une prodigieuse mémoire et son érudition était très vaste. Au temps de sa jeunesse, ses relations et ses lectures avaient formé son goût pour les belles-lettres et les beaux-arts. Il avait eu l'heureuse fortune d'être accueilli comme un fils dans la famille d'Alphonse Daudet, et Léon Daudet fit, un peu plus tard, dans un de ses livres, un portrait plein d'originalité et de saveur du brillant camarade dont il est resté l'ami.

A l'âge de cinquante ans il se résolut à étudier les mathématiques spéciales parce qu'il les jugeait nécessaires à la compréhension des phénomènes qui commandent les relations des antigènes avec les anticorps. Il était vraiment passionné pour la recherche, et sa passion se traduisait souvent par des critiques impitoyables, par des explosions verbales quelquefois violentes, qu'il regrettait aussitôt, car il était foncièrement émotif et bon, tout en affectant des airs d'indépendance et de hautain mépris pour ceux qui ne partageaient pas les idées qu'il croyait justes. Mais ces défauts apparents de caractère ne lui créaient pas d'ennemis. On ne lui gardait pas rancune de ses boutades et on recherchait sa conversation toujours instructive, pleine de vie et d'imprévu. Il aimait à faire profiter de ses vastes connaissances ceux d'entre nous qu'il honorait de son amitié.

Depuis des années la vie de Maurice Nicolle était un long martyre. La mort, en le délivrant de ses souffrances, nous enlève l'un des meilleurs parmi les aînés de notre grande famille, l'un de ceux qui ont le plus contribué à maintenir à

travers le monde le prestige de l'Institut Pasteur. Nous qui lui survivons, et ceux qui nous suivront, aurons profit à nous inspirer du bel exemple de sa vie laborieuse.

Tous les pasteuriens s'associent à la douleur de son fils, de sa famille, et à celle de son frère Charles, dont il fut le guide à ses débuts dans la carrière scientifique qu'il continue à illustrer.

A. CALMETTE.

**AU SUJET DES RELATIONS
ENTRE L'ALLERGIE TUBERCULINIQUE ET L'IMMUNITÉ
DANS LA TUBERCULOSE (1),**

par A. CALMETTE.

(*Institut Pasteur, Paris.*)

Entendons-nous d'abord sur ce fait que l'allergie est un état de l'organisme très différent de l'anaphylaxie. Cette différence est essentiellement basée sur ce que l'anaphylaxie ne peut être déterminée que par la substance même qui déclenchera le choc anaphylactique, tandis que l'allergie tuberculeuse peut être déclenchée par une substance, — en l'espèce la *tuberculine* — qui est incapable de l'engendrer. Dans la genèse de cette allergie tuberculeuse, l'infection bacillaire intervient seule.

L'allergie est une réaction révélatrice d'un état d'infection. Elle peut être masquée par une autre allergie (rougeole, coqueluche, grippe), par des intoxications diverses, par l'effet des radiations ultra-violettes sur la peau, etc. Mais elle réapparaît dès que cesse l'influence de ces facteurs.

Elle peut paraître révélée par des substances non spécifiques, complètement étrangères au bacille tuberculeux, par exemple par des injections de *Bacterium coli*, de bacilles typhiques ou paratyphiques, d'extraits de divers organes, de sérum de porc, etc. (Uhlenhut, Keller, Moro, Paul Bordet); mais il s'agit là de phénomènes *para-allergiques* dus aux protéines microbiennes. Leur durée est brève, tandis que l'allergie est durable, persistante pendant des années jusqu'à la disparition totale des lésions de symbiose bacillo-cellulaire qui l'ont déterminée.

L'allergie peut-elle être, en même temps qu'une réaction d'infection, une réaction révélatrice d'un état d'immunité?

(1) Note communiquée le 7 septembre 1932 à la VIII^e Conférence de l'Union internationale de lutte contre la tuberculose, à La Haye.

Je ne le crois pas, pour les raisons suivantes :

1° Les organismes naturellement immuns contre l'infection tuberculeuse ne se montrent jamais allergiques, même après qu'ils ont été inoculés avec des bacilles très virulents pour les espèces sensibles;

2° Les organismes sensibles bacillisés ne sont pas toujours allergiques, bien qu'ils se révèlent immuns vis-à-vis des surinfections virulentes. Je l'ai constaté avec C. Guérin chez les bovidés. Nasta à Bucarest, Willis, A. R. Rich à Baltimore, A. Boquet, L. Nègre, J. Valtis, A. Saenz dans mon laboratoire, en ont également fourni de multiples exemples chez les cobayes ;

3° Certains facteurs *anergisants*, tels que les radiations ultraviolettes, inhibent l'allergie et n'influencent pas l'immunité ;

4° On peut faire disparaître l'allergie par l'accoutumance à des doses progressives de tuberculine sans que la résistance aux surinfections soit diminuée (Et. Burnet, A. Manaud). Par la tuberculinothérapie de la tuberculose chez l'homme, on s'efforce de désensibiliser l'organisme et, lorsque l'allergie disparaît, la résistance du sujet, au lieu de s'affaiblir, devient plus grande.

5° Enfin, S. Lyle Cummins a constaté qu'en Afrique du Sud une très forte proportion des sujets de race noire employés dans les mines du Transvaal réagissent à la tuberculine lors de leur embauchage, et cependant ils paraissent n'avoir aucune immunité. Chez ces noirs, plus l'allergie est marquée, plus l'infection est active.

On doit donc admettre que *l'allergie n'est pas une manifestation d'immunité*. Elle est exclusivement, — et son rôle comme tel est infiniment précieux, — le signe avertisseur d'une infection bacillaire. Elle n'apparaît que lorsque la vie symbiotique des bacilles avec les cellules macrophages a constitué ce que j'ai appelé le « tubercule élémentaire » (tuberculoocyte de Bessau), dont le *follicule* ou *granulation grise* de Laennec est un stade d'évolution plus avancé.

Si nous envisageons l'allergie dans ses rapports avec les infections virulentes, il nous faut reconnaître qu'elle n'a qu'une portée relativement restreinte. Elle ne nous renseigne ni sur l'intensité, ni sur la bénignité ou la gravité, ni sur les localisations, ni sur l'état actuel de l'infection. De sorte que nous ne

pouvons pas savoir si un sujet se révèle allergique parce qu'il est porteur de lésions multiples, étendues, évolutives, ou parce qu'il est seulement infecté par quelques bacilles peu virulents qui ont créé dans son organisme un état de *prémunition*, c'est-à-dire de résistance aux surinfections, ou d'immunité.

Par contre, vis-à-vis de la vaccination préventive, ou prémunition artificiellement réalisée par le BCG chez les jeunes enfants qui n'ont pas encore pris contact avec les bacilles virulents, comme dans les belles expériences de Léon Bernard avec Robert Debré, et dans celles de Wallgren, — ce rôle de l'allergie est de toute première importance. La constatation de son existence nous avertit que les bacilles BCG, privés de virulence et inoffensifs, se sont sûrement multipliés dans les organes lymphatiques de l'enfant, qu'ils y vivent en symbiose avec des macrophages, qu'ils y ont créé des tubercules élémentaires et qu'ils déterminent ainsi, pour un temps probablement très long (plus de cinq ans d'après Robert Debré) et avec toutes les garanties d'innocuité désirables, cet état de prémunition qui rend inoffensives les surinfections virulentes.

Il est donc évident que, vis-à-vis de l'infection bénigne et vaccinante produite par le BCG, l'allergie offre cet immense intérêt de nous apporter la preuve que l'organisme est réellement imprégné de bacilles prémunisants. Elle nous permet donc, — mais seulement pour les enfants vaccinés qui ont pu être mis à l'abri de tout contact virulent, — d'affirmer que le sujet est réellement prémuni, et qu'il peut désormais vivre impunément en milieu contaminé.

Pour les autres, pour ceux qui, dès les premières semaines après leur naissance, ont vécu sans mesures d'isolement, sans précautions spéciales de préservation des contacts avec des bacillifères, il nous est impossible de savoir, lorsqu'ils deviennent allergiques, si cette allergie est le fait du BCG ou des bacilles virulents de surinfection, qu'ils ont d'ailleurs presque toujours impunément absorbés parce qu'ils avaient été précédemment prémunis.

L'allergie n'offre donc pour eux aucune signification. Pourtant, les travaux récents de Robert Debré, Marcel Lelong et M^{lle} Pictet, à l'Œuvre du placement familial des Tout-Petits, et ceux antérieurs de Wallgren, de B. Weill-Hallé, de O. Scheel

de Heimbeck, de Parisot et Saleur, de L. Sayé, semblent prouver que les réactions allergiques dues au BCG seul se différencient nettement, par leur intensité et leur aspect, des réactions allergiques consécutives aux contaminations virulentes. Mais ceci est une autre affaire. Pour le moment, il s'agit de savoir si l'allergie, *réaction d'infection*, est en même temps une *réaction d'immunité*. Les faits et les considérations qui précèdent répondent par la négative.

Une conclusion d'ordre pratique s'en dégage.

On constate que dans certaines nations (Grande-Bretagne, Etats-Unis, Danemark, etc.), la mortalité tuberculeuse paraît être en régression depuis quelques années, bien que la vaccination préventive n'y soit encore utilisée qu'exceptionnellement. Peut-être est-ce dû à ce que les mesures prophylactiques y sont mieux ordonnées, donc plus efficaces qu'ailleurs, les contacts infectants devenant plus rares et mieux surveillés. Il faudrait alors établir si le nombre des allergiques y est moindre. Dans l'affirmative, on doit se demander ce que réserve l'avenir à ces populations en train de se priver de la protection conférée par une infection spontanée légère ou par la prémunition au moyen du BCG. Bientôt sans doute, — puisque nous savons que l'immunité héréditaire est inexistante ou très fugace, — elles se trouveront dans l'état d'extrême sensibilité à l'infection bacillaire qui s'observe de nos jours chez les jeunes enfants et chez les indigènes africains ou polynésiens non allergiques, vierges de contamination tuberculeuse. Avec les progrès incessants de la circulation et des échanges commerciaux, elles seront alors en infériorité flagrante, et la tuberculose les décimera.

Dans la négative, c'est-à-dire si le nombre des allergiques est resté, parmi ces populations, ce qu'il était hier, il faut en conclure que la diffusion de l'infection bénigne, spontanément prémunisante, continue à se réaliser, et que s'établit, par suite, peu à peu une immunité plus générale. S'il en est ainsi, on gagnerait en rapidité, et en sécurité, à lui substituer la prémunition artificielle par un bacille-vaccin également allergisant, mais sûrement inoffensif pour toutes les espèces animales comme pour l'espèce humaine, tel que le BCG.

Puisque, dans la tuberculose, l'immunité n'apparaît et ne

persiste que dans les organismes parasités par des bacilles inoffensifs, nous devons envisager *l'allergie révélatrice d'une infection bénigne vaccinnante* comme un *témoin* précieux, certainement fidèle, — le seul d'ailleurs dont nous disposions aujourd'hui, — de l'existence et de la persistance de cette infection. *Il faut s'efforcer d'allergiser, dès après leur naissance, tous les êtres humains* pour les mettre en état de tolérer sans dommages les surinfections virulentes auxquelles il leur est bien difficile de ne pas être un jour ou l'autre exposés.

C'est de cette vérité évidente que devraient se pénétrer les autorités sanitaires qui, dans toutes les nations civilisées, ont la charge d'assurer la protection de la santé publique.

**RECHERCHES SUR L'IDENTIFICATION DES *BRUCELLA*
ISOLÉES EN FRANCE
PAR L'ACTION BACTÉRIOSTATIQUE
DES MATIÈRES COLORANTES
ET LA PRODUCTION D'HYDROGÈNE SULFURÉ
(HUDDLESON)**

(MÉMOIRE PRÉLIMINAIRE)

par R. M. TAYLOR, M. LISBONNE et G. ROMAN (1).

L'histoire de la découverte des relations qui unissent *Micrococcus melitensis* et *Bacillus abortus* et de la création du genre *Brucella* en bactériologie ne manque pas d'un imprévu assez humoristique.

Ces deux genres virent le jour dans des contrées très éloignées l'une de l'autre : une île méditerranéenne, les bords de la Baltique. Le premier fut isolé (Bruce) des organes et du sang d'hommes atteints de la maladie désignée alors sous le nom de « fièvre de Malte », et plus tard (Zamitt) de l'organisme de chèvres de ce pays ; le second fut isolé (Bang) du délivre et du fœtus de vaches atteintes d'« avortement épizootique ».

Longtemps ils firent figure d'espèces étrangères l'une à l'autre au point d'être classées respectivement dans le genre *Coccus* et dans le genre *Bacillus*, jusqu'au jour où Miss Alice Evans (1917) [4] eut l'indiscutable mérite de mettre en évidence les ressemblances qui unissaient ces deux microbes, ressemblances si étroites que, mis à part l'artifice de l'absorption des agglutinines, nul caractère ne permettait de les différencier ; et encore ce critérium sérologique apparut-il si précaire que

(1) Du « Centre de Recherches sur la fièvre ondulante », Institut Bouisson-Bertrand, Montpellier, Hérault, France. Ces recherches ont été rendues possibles grâce à une subvention de la Division internationale de la Santé Publique de la Fondation Rockefeller en France.

Meyer et ses collaborateurs n'hésitèrent pas à les réunir tous deux dans un nouveau genre qu'il créa à cette occasion : le genre *Brucella*. Les microbes étrangers devenaient frères, frères jumeaux même, si indiscernables entre eux que Burnet les qualifiait, d'une façon imagée, de « Menéchmes », de « Sosies » de la bactériologie.

Ce groupe *Brucella* a de plus en plus attiré l'attention des bactériologistes au cours de ces dernières années. Des multiples recherches qu'il a suscitées, semble se dégager la nécessité de lui assigner trois variétés se distinguant par quelques caractères personnels, mais parfois inconstants. Nous désignons ces trois variétés sous les noms de :

Brucella melitensis;

Brucella abortus bovis;

Brucella abortus suis (1).

Quoiqu'une infection croisée puisse être provoquée artificiellement ou même se produire naturellement, comme par exemple la contamination de la vache par *Br. melitensis* ou par *Br. abortus suis*, chacune d'elles semble cependant posséder certaines aptitudes pathogènes électives qui les font s'attaquer de préférence à la vache dans le cas de l'*abortus bovis*, aux porcs dans le cas de l'*abortus suis*, et à la chèvre s'il s'agit de la variété *melitensis*. Du moins, est-ce dans chacune de ces catégories animales que l'on trouve généralement les variétés respectives de *Brucella*, et il est vraisemblable que, dans des conditions ordinaires, elles constituent chacune le réservoir permanent pour leur type particulier de *Brucella*.

Fait plus important encore, du point de vue de l'épidémiologie humaine, ces variétés semblent se différencier par leur

(1) Ces termes, aujourd'hui couramment employés, ne correspondent pas exactement aux règles de la priorité en usage dans la nomenclature. Meyer, confirmant les travaux d'Evans, avait proposé la création du genre nouveau *Brucella* adopté maintenant par tous. Miss Evans proposa les noms de *Brucella melitensis*, variété *melitensis* et de *Brucella melitensis*, variété *abortus* pour les deux sous-genres alors connus. Lors de la découverte de la variété porcine (Traum) la nomenclature eût exigé pour cette dernière l'appellation « *Brucella melitensis*, variété *abortus*, type *suis* ». C'était une terminologie assez compliquée. Si ces variétés sont promues au rang d'espèces, il est alors justifié d'employer les termes *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*. Huddleson, entrant dans ces vues, va plus loin encore et classe dans le genre *Brucella* trois espèces respectivement appelées *Brucella melitensis*, *Brucella abortus* (variété bovine) et *Brucella suis* (variété porcine).

aptitude pathogène vis-à-vis de l'homme : *Brucella melitensis* occupe la première place par sa virulence, *Brucella abortus suis* des Etats-Unis le suit de près; *Brucella abortus bovis* est le dernier.

Si ces notions sont correctes — et les observations accumulées jusqu'à présent semblent l'indiquer — on se rend compte de l'intérêt considérable qui s'attache à la différenciation de ces variétés.

Nous n'avons pas l'intention de décrire ici en détail les diverses méthodes de laboratoire qui ont été proposées pour cette différenciation, ni de porter un jugement sur leur valeur respective. Ceux que ce sujet intéresse particulièrement en trouveront, sous la signature de Wilson [2], une brève mais très intéressante revue. Nous nous contenterons d'énumérer les procédés qui ont attiré le plus l'attention.

1° BESOIN DE CO_2 . — Les *Br. melitensis* et *abortus suis* poussent facilement en air libre dès leur isolement initial. Par contre, la plupart des souches bovines exigent une atmosphère contenant une assez grande quantité de CO_2 (la quantité de CO_2 nécessaire pour obtenir la croissance optima est de 10 p. 100 environ). Cependant, il ne faut pas oublier que quelques cultures bovines perdent rapidement cette particularité et poussent parfaitement en air libre après quelques générations en milieu artificiel. Ce caractère n'a donc de valeur que lorsqu'il est positif et surtout quand il s'agit de cultures récemment isolées; de toute manière, le fait qu'une souche exige du CO_2 pour pousser constitue une présomption des plus sérieuses en faveur d'un *abortus bovis*.

2° PRODUCTION D' H_2S . — Huddleson [3 et 4] a montré que sur un milieu de culture agar au foie la variété porcine produit en abondance H_2S pendant une période de quatre ou cinq jours. La variété bovine en produit moins et moins longtemps, tandis que *Br. melitensis* n'en produit que peu ou pas, et pendant vingt-quatre heures seulement. Cette particularité se vérifie quand on considère chacun des trois groupes dans son ensemble, mais dans chaque groupe il n'est pas rare de rencontrer des variations individuelles.

Notre expérience nous a montré que ces exceptions s'appliquent surtout aux souches bovines; quelques-unes de celles-ci peuvent, en effet, ne pas produire H^2S , ou seulement pendant les vingt-quatre premières heures, se comportant ainsi comme un *melitensis* tandis que quelques autres peuvent produire H^2S , aussi abondamment qu'*abortus suis*.

Par contre, nous n'avons jamais trouvé de souches considérées comme *Br. melitensis* qui aient produit H^2S au delà du premier jour.

La variété « porcine » trouvée au Danemark ne produit pas H^2S . Cette variété, qui se rencontre chez les porcs, a des caractères communs avec la variété porcine des Etats-Unis; elle en diffère cependant par son absence de pouvoir pathogène pour l'homme. En effet, on n'a pas signalé au Danemark de malade infecté par ce germe, tandis qu'aux Etats-Unis il s'est montré plus pathogène pour l'homme que le type bovin.

3° ACTION BACTÉRIOSTATIQUE DES COLORANTS. — C'est encore à Huddleson que nous sommes redevables de cette méthode.

Utilisant pour l'ensemencement un milieu agar au foie, de $pH = 6.6$, additionné de pyronine en solution à 1/200.000, de violet de méthyle à 1/100.000, de thionine à 1/30.000, de fuchsine basique à 1/25.000, il a montré par l'examen d'un grand nombre de souches que la variété *melitensis* n'était pas inhibée, ou très peu, dans de tels milieux.

Au contraire, le type bovin ne pousse pas dans le milieu à la thionine, et pousse très bien sur les trois autres. Inversement, le type porcine pousse dans le milieu à la thionine et non sur les autres.

La fidélité de cette méthode a été confirmée par d'autres bactériologistes américains, et aussi par Kristensen [5] sur les souches isolées au Danemark.

4° ABSORPTION DES AGGLUTININES. — On aurait pu penser que cette méthode de choix, si précieuse en bactériologie, s'avérerait aussi la plus fidèle dans la différenciation des caractères biologiques fondamentaux. Il n'en est rien; elle s'est au contraire montrée très décevante, donnant des résultats discordants entre les mains des différents opérateurs. Tandis qu'un

grand nombre de souches du type *melitensis* et bovin réagissent correctement, c'est-à-dire se classent dans le groupe que leur assigne leur origine, d'autres se comportent différemment; de plus, la différenciation du type porcin est particulièrement difficile.

Il est possible, comme le suggère Wilson [6], que ces anomalies soient attribuables à la transformation partielle ou totale des souches en formes « R » non spécifiques; ces formes « R » qui agglutinent par la chaleur, par les sels concentrés et par les acides et représentent peut-être ce que l'on appelle les *para-melitensis* et *para-abortus* (Pandit et Wilson [7]). Ce qui revient à dire que les méthodes employées pour différencier les formes « para » ne font que dissocier les variétés « R » des formes spécifiques « S ».

De plus, malgré l'intérêt que présente par ailleurs la méthode de classification par absorption des agglutinines, elle a l'inconvénient non seulement d'exiger une technique de laboratoire compliquée et fastidieuse, mais de ne pouvoir être appliquée aux souches qu'avant que la transformation en type « R » ne soit apparue.

5° UTILISATION DU GLYCOSE. — Mc Alpine [8] et Slanetz croient qu'il est possible de faire une différence entre les trois variétés par leur pouvoir d'utilisation du glycose. Ici encore, ce pouvoir distinctif peut être perdu ou considérablement diminué par un long séjour en milieu artificiel; et de même pour la production d'H₂S, les résultats probants, quand il s'agit d'un groupe considéré dans son ensemble, se montrent incertains et douteux dans l'identification d'une souche particulière.

6° POUVOIR PATHOGENE. — Ce caractère, qui, en un sens, est de la plus haute importance, n'est malheureusement pas aisé à étudier sur un grand nombre de souches, sauf sur les petits animaux de laboratoire. Le cobaye est l'animal le plus utilisé, mais les résultats ne sont pas toujours très nets, et peuvent varier avec l'âge d'isolement de la culture. Les souches porcines et *melitensis* semblent être les plus pathogènes pour le cobaye; le type bovin, le moins pathogène.

Peu d'études ont été faites sur la comparaison des différentes

méthodes que nous venons d'énumérer. Kristensen [9] au Danemark et Francis [10] aux Etats-Unis estiment que la méthode d'agglutination se montre souvent différente de la classification fournie par la réaction bactériostatique des colorants. Prise en considération l'origine animale des souches qu'ils ont étudiées, on est amené à conclure de leurs recherches que c'est cette dernière méthode qui donne les résultats les plus fidèles. Wilson [6], de son côté, a trouvé que quelques-unes des souches isolées dans le sud de la France se comportaient davantage comme type bovin, par la méthode d'absorption des agglutinines, tandis que les mêmes souches, dans nos mains, s'identifiaient en *melitensis* parla méthode des colorants et la production d'H²S.

Nous nous proposons, dans cet article, de publier nos expériences de classification par l'action bactériostatique des colorants, production d'H²S, développement en CO², effectuées avec des cultures récemment isolées et groupées par distribution géographique, suivant leur origine animale, et à la lumière du contrôle épidémiologique.

La technique que nous avons employée est exactement celle qu'a décrite Huddleson, à savoir :

I. — ÉPREUVE DE PRODUCTION D'H²S.

Préparation du milieu. Le milieu consiste en une macération de foie de bœuf et agar ajusté au pH = 6,6, et dont la formule détaillée est la suivante :

NaCl	5 grammes.
Peptone (Bacto).	10 —
Agar	20 —
Eau.	500 —
Macération de foie de bœuf.	500 —

Le foie de bœuf frais est coupé en fins morceaux et broyé au moyen d'une machine à hacher la viande. On ajoute 500 cent. cubes d'eau à chaque 500 grammes de cette pulpe. Le tout est soumis à ébullition pendant une heure environ; remuer fréquemment. Après quoi on porte à l'autoclave jusqu'à une température de 120°. On filtre à travers un tamis, la partie solide forme une croûte à la surface; le liquide filtré constitue la macération de bœuf. On le verse dans des flacons qu'on stérilise; il est alors prêt à servir. Sa conservation est de longue durée. Le filtrat obtenu contient encore quelque matière en suspension, aussi est-il bon, après l'avoir laissé au repos quelque temps, de le décantier; on obtient de cette façon un liquide suffisamment clair.

A 500 cent. cubes d'eau on ajoute 20 grammes d'agar lavé, 10 grammes de peptone et 5 grammes de chlorure de sodium. On fait fondre l'agar soit au bain-marie, ou mieux à l'autoclave, et on mélange à parties égales cette solution et la macération de foie de bœuf.

A ce moment, on ajuste approximativement à un $pH=7$; on maintient à température environ 55 et 60° et on ajoute un blanc d'œuf à chaque litre de milieu. On place alors le tout à l'autoclave à 120° pendant une demi-heure. Enfin, on filtre à travers du coton de verre préalablement lavé avec une solution faiblement acidulée. En pratiquant une nouvelle détermination, on constate généralement que le pH est tombé aux environs de 6.6. La correction nécessaire est faite par addition d'acide ou d'alcali pour porter la réaction à ce taux. On met alors en tubes et on stérilise.

Papier réactif. Une certaine quantité de papier filtre est coupée en carrés de 10 centimètres de côté environ. On place ces carrés dans un récipient plat contenant une solution saturée d'acétate de plomb dont ils s'imprègnent. On les place sur du papier-filtre propre et on laisse sécher à l'obscurité. Les carrés de papier-filtre ainsi imprégnés et séchés peuvent être soit coupés en bandes de 1/2 centimètre environ et placés dans un flacon noir hermétiquement bouché, soit conservés intacts dans du papier noir et coupés en bandes seulement au moment de leur emploi.

Disposition de l'expérience. On ensemence en surface la culture à examiner sur le milieu précédent en tube incliné. Le papier à l'acétate de plomb est placé entre le bouchon de coton et la paroi intérieure du tube, du côté opposé au milieu de culture, le bord inférieur de la bande de papier se trouvant au même niveau que la partie supérieure du milieu incliné. On porte alors la culture à l'étuve; après vingt-quatre heures on retire la bande de papier et on note le changement de coloration. La production d' H^2S provoque un noircissement du papier à l'extrémité inférieure, c'est-à-dire au voisinage de la culture.

Le degré de noircissement étant noté, on place une nouvelle bande de papier dans le tube et l'on recommence ainsi pendant quatre jours en notant chaque jour la quantité de noircissement obtenu. L'intensité de production d' H^2S peut varier quelque peu suivant les différents échantillons de milieu, du fait de leur teneur différente en soufre; mais dans nos expériences personnelles, malgré l'utilisation de milieux divers, la variété *melitensis* ne produisait jamais d' H^2S en quantité perceptible au delà des premières vingt-quatre heures, tandis que les types *abortus* déterminaient un noircissement du papier des plus nets plusieurs jours de suite.

Les cultures du type bovin, réclamant une atmosphère de CO^2 pour un bon développement, sont mises à l'étuve dans un bocal contenant 10 p. 100 de CO^2 .

II. — ÉPREUVE DE L'ACTION BACTÉRIOSTATIQUE DES COLORANTS.

Le milieu utilisé est le même que celui qui a été décrit ci-dessus, mais au lieu de le répartir en tubes on le verse dans des bouteilles de 100 cent. cubes.

On fait une solution à 0,5 p. 100, dans de l'eau distillée, des colorants suivants : thionine, fuchsine basique, violet de méthyle et pyronine. Ces solutions aqueuses se conservent sans inconvénient pendant plusieurs mois. Ainsi que l'a recommandé Huddleson, nous nous sommes servis de colo-

rants préparés par la « National Anilin Chemical Co ». Il est possible que d'autres marques donnent des résultats satisfaisants, mais il sera bon, auparavant, de les contrôler.

Les bouteilles contenant 100 cent. cubes de milieu, ramené à un $\text{pH} = 6.6$, sont alors chauffées jusqu'à complète fusion de l'agar, et pendant qu'elles sont encore chaudes on ajoute une quantité suffisante de la solution-mère de colorant, de manière à obtenir la dilution finale de milieu, à savoir : thionine 1/30.000, fuchsine basique 1/25.000, violet de méthyle 1/100.000, pyronine 1/200.000. On agite alors les bouteilles de manière à répartir le colorant d'une façon homogène dans le milieu, et l'on en verse environ 25 cent. cubes dans chacune d'une série de boîtes de Pétri. Dès que le milieu est solidifié les boîtes de Pétri sont retournées, couverte en bas, et placées à l'étuve où on les laisse sécher inclinées pendant trois heures environ. Ce dernier point est de la plus haute importance, car s'il restait de l'eau de condensation à la surface de la gélose la culture aurait tendance à s'étaler et à envahir les voisines.

Un trait de crayon gris divise les boîtes en deux parties dans chaque direction, de manière à obtenir quatre cadrans égaux. Dans le milieu de chacun de ces cadrans on ensemence la culture à examiner sur une surface d'environ 1 cent. carré au moyen d'une anse de platine; chaque boîte peut servir ainsi à examiner quatre cultures, si l'on a soin de les placer exactement dans le centre de chaque division. Il faudra éviter toute éraillure de la surface du milieu. Les ensemencements devront provenir de cultures fraîches (vingt-quatre heures) et afin d'obtenir un égal ensemencement il vaut mieux faire une émulsion dans le fond du tube de gélose, soit en utilisant l'eau de condensation, soit, si elle est insuffisante, en ajoutant quelques gouttes de bouillon stérile.

En plus du milieu contenant les colorants, on fait une série de boîtes contenant également le même milieu, mais sans addition de colorant pour servir comme contrôle de l'intensité de la culture.

Les boîtes sont mises à l'étuve et lecture en est faite à la fin de chaque vingt-quatre heures pendant trois jours successifs. La lecture finale à la fin du troisième jour donne généralement les résultats les plus précis; mais, à notre opinion, il y a un certain avantage à faire des lectures fractionnées de manière à déterminer les degrés d'inhibition. En règle générale, les résultats sont des plus nets. Comme nous l'avons signalé précédemment, l'*abortus* bovin est inhibé par le milieu en thionine, mais pousse sur les trois autres, tandis qu'*abortus* suis, au contraire, pousse sur thionine et est inhibé par les autres colorants.

Nous avons examiné jusqu'à présent, à la lumière de ces épreuves 191 souches de *Brucella* isolées en France (1). Ainsi que le montre le tableau IV, elles viennent de 31 départe-

(1) Nous sommes reconnaissants au Professeur Rinjard, du Laboratoire national de Recherches d'Alfort, d'avoir bien voulu nous envoyer 34 souches bovines, 1 d'origine ovine et 3 d'origine équine; aux Dr^s Dubois et Sollier, d'une souche humaine; d'une souche de chèvre, et d'une de brebis; aux Professeurs Parisot et Lemierre d'une souche chacun, et à l'Institut Bouisson-Bertrand de 13 souches humaines. Les 135 autres furent isolées par le Centre pendant les années 1931 et 1932.

ments : 131 étaient d'origine humaine, 41 d'origine bovine, 6 provenaient de chèvres, 10 de brebis et 3 de juments.

Les tableaux I et II exposent les résultats de nos expériences.

TABLEAU I. — Classification des souches d'après le dégagement d'H²S.

ORIGINE	NOMBRE de souches examinées	NOMBRE DE SOUCHES ayant produit de l'H ² S	
		Pendant 1 jour au pl. s	De 2 à 4 jours
Humaine.	131	129	2
Bovine.	41	11	30
Caprine.	6	6	0
Ovine.	10	9	1
Equine.	3	0	3

TABLEAU II. — Classification des souches par les colorants.

ORIGINE	NOMBRE	CULTURE SUR THIONINE		CULTURE SUR FUCHSINE	
		+	—	+	—
Humaine.	131	129	2	131	0
Bovine.	41	4	37	38	3
Caprine.	6	6	0	6	0
Ovine.	10	9	1	10	0
Equine.	3	0	3	3	0

L'ensemble de ces caractères biologiques et leur combinaison dans chaque variété étudiée prennent place dans le tableau III dont la lecture appelle quelques justifications et explications :

On notera que la concordance est complète entre les résultats fournis par les deux méthodes pour 179 souches sur 191 étudiées ; c'est-à-dire que les souches qui libèrent H²S pendant plus de vingt-quatre heures poussent sur milieu à la fuchsine et sont inhibées par le milieu à la thionine, et celles qui ne produisent pas H²S ou n'en produisent que durant vingt-quatre heures poussent également sur milieu à la thionine et milieu à la fuchsine.

Il y a discordance de résultats dans 12 cas seulement :

1° Huit souches d'origine bovine ne libèrent pas H₂S et se comportent pourtant comme *Br. abortus* dans l'épreuve de la bactériostase (inhibition complète par la thionine).

TABLEAU III. — Classification des souches par développement d'H₂S et l'épreuve des colorants.

ORIGINE	NOMBRE	PRODUCTION d'H ₂ S au-dessus de 24 heures		DÉVELOPPEMENT sur milieux avec colorants				CLASSIFICATION		
		+	—	Sur thionine		Sur fuchsine		W Type	A/c. Type	Atypiques
				+	—	+	—			
Humaine.	131	2	129	129	2	129	2	129	2	
Bovine.	41	26			26	26			26	
		3			3		3			3
		1	8	4	8	4	8		8 (1)	4
			3	3		3	3	3		
Caprine	6		6	6		6		6		
Ovine	10	4	9	9	4	9	4	9	4	
Equine.	3	3			3	3			3	
Total	191	36	155	148	43	188	3	147	40	4

(1) Ces souches sont classées *abortus* bovin malgré leur inaptitude à libérer H₂S (voir explication dans le texte).

En raison de ce caractère et vu leur origine, nous estimons qu'elles appartiennent à la variété *abortus bovis*; aussi les avons-nous classées comme telles, malgré leur inaptitude à produire H₂S.

2° Trois souches se refusent à pousser dans les milieux à la thionine et dans ceux à la fuchsine; on ne peut donc les classer par cette méthode.

Toutes les trois libèrent H₂S pendant plusieurs jours. L'une, isolée par le Centre, réclame CO₂ pour les premières cultures,

et les deux autres (adressées par le Professeur Rinjard) poussent mieux, aujourd'hui encore, en présence de ce gaz.

Enfin, une souche végétale, quoique difficilement, sur thionine, mais elle produit H^2S en abondance et s'accommode mieux d'une atmosphère enrichie en CO^2 .

Ces quatre souches sont évidemment atypiques, mais du fait qu'elles produisent H^2S , qu'elles poussent mieux en CO^2 et vu leur origine animale, nous pensons qu'elles se rattachent plus étroitement à la variété *abortus* qu'à la variété *melitensis*.

De la comparaison de ces deux méthodes se dégage pour nous actuellement l'impression que, lorsqu'elle donne des réponses claires — et c'est le plus souvent le cas — l'épreuve basée sur la bactériostase par la fuchsine et la thionine est la plus fidèle et la plus constante. Celle basée sur la production d' H^2S donne des résultats parallèles dans la plupart des cas, risque cependant parfois de ne pas pouvoir caractériser *Br. abortus* bovin.

D'autre part, la production d' H^2S par une souche au delà de vingt-quatre heures est une forte présomption qu'elle n'appartient pas à la variété *melitensis*, car nous n'avons jamais rencontré de *melitensis*, typique par ailleurs, qui produise H^2S au delà de vingt-quatre heures.

III. — BESOIN DE CO^2 .

Dans notre introduction sur les méthodes d'identification, nous avons signalé que ce facteur ne peut en général être étudié d'une façon satisfaisante que sur des cultures récemment isolées, du fait que le besoin de CO^2 peut se perdre rapidement après isolement. Par conséquent, nous croyons devoir limiter nos observations aux 135 souches isolées par le Centre, chez lesquelles il nous a été possible d'observer les besoins de CO^2 dès le premier isolement et dans les premiers repiquages. Toutes nos hémocultures, qu'elles proviennent d'organismes naturellement infectés ou de cobayes infectés par inoculation de lait, sont faites en double exemplaire. L'un est mis à l'étuve dans les conditions atmosphériques ordinaires, c'est-à-dire en air libre, l'autre en présence de 10 p. 100 de CO^2 . Cette remarque s'applique également aux premiers repiquages.

Ces 135 souches comprennent 115 humaines, 7 bovines,

5 caprines, et 8 ovines. Toutes, sauf 2 humaines et 4 bovines, ont poussé en air libre depuis le début et sont classées comme *melitensis* par la bactériostase. Les 2 souches humaines et 3 des souches bovines qui ont exigé du CO_2 réagissent d'une façon typique comme *abortus* sur les milieux colorés et par la production d' H_2S . La quatrième des souches bovines, atypique en ce sens qu'elle est inhibée dans tous les milieux colorés, produit H_2S en quantité moyenne pendant une période de quatre jours. Ces faits démontrent que l'exigence en CO_2 d'une culture primitive s'harmonise parfaitement avec son comportement attendu vis-à-vis des milieux colorés et de la production d' H_2S .

Le tableau suivant (Tableau IV) indique les départements d'où les souches proviennent, l'hôte d'où elles ont été isolées et la variété de *Brucella* que nous leur avons attribuée. On notera que la classification de ce tableau repose sur les résultats de la bactériostase. C'est ainsi que 8 souches d'origine bovine sont classées *abortus* malgré leur inaptitude à produire H_2S au delà d'un jour, comme on l'a dit précédemment.

Par contre, nous avons classé aussi comme *abortus* les 3 souches bovines inhibées par tous les colorants (et par conséquent inclassables par cette méthode) parce que :

a) Elles produisent, toutes, H_2S en quantité notable pendant plusieurs jours ;

b) L'une d'elles exigeait CO_2 au début et les deux autres poussent actuellement encore mieux en CO_2 .

Enfin, nous avons cru devoir classer comme *abortus* une souche d'origine bovine, quoique — *seule exception rencontrée dans notre étude* — elle ait poussé (non sans difficulté du reste) sur milieu à la thionine ; elle libère H_2S plusieurs jours et pousse mieux dans une atmosphère contenant 10 p. 100 de CO_2 ; de sorte que ces deux derniers caractères positifs ont paru l'emporter pour la classification.

DISCUSSION.

Laissant de côté les 4 souches atypiques qui forment peut-être un groupe intermédiaire, qu'est-ce qui peut nous faire penser que les classifications auxquelles nous arrivons sont correctes ?

TABLEAU IV. — Distribution géographique, origine animale et classification des souches de *Brucella*.

RÉGIONS et départements	HUMAINES		ANIMALES								TOTAL	
	M.	Ab.	Bovines		Caprines		Ovines		Equines		M.	Ab.
			M.	Ab.	M.	Ab.	M.	Ab.	M.	Ab.		
<i>Nord :</i>												
Aisne				5				1				
Pas-de-Calais												
Seine-et-Oise				13								
Total												19
<i>Ouest :</i>												
Eure				2								
Ille-et-Vilaine				1								
Loire-Inférieure				1								
Sarthe				1								
Seine-Inférieure				1								
Total												6
<i>Centre :</i>												
Allier				1								
Loire				1								
Nièvre				1					2			
Rhône				1								
Total												6
<i>Sud-Ouest :</i>												
Ardèche	27				5		2					
Aude	5											
Aveyron	2											
Gard	2				1		1					
Gironde				2								
Hérault	58						4					
Lozère	2											
Tarn				2								
Total											109	6
<i>Sud-Est :</i>												
Bouches-du-Rhône	3											
Drôme	2		2				1					
Hautes-Alpes	5											
Isère	12											
Total											25	
<i>Est :</i>												
Bas-Rhin	1				3							
Marne												
Meurthe-et-Moselle	8	1	1				1					
Meuse				1								
Moselle	1											
Saône et-Loire				1					1			
Vosges		1		1								
Total											12	9
Corse	1										1	
Total général	129	2	3	38	6	0	9	1	0	3	147	66

Nota. — M., indique les souches qui ont été classées comme variété *melitensis*. Ab., celles qui ont été classées comme variété *abortus* (bovis).

Une telle classification bactériologique ne peut présenter d'intérêt pour le médecin et pour le vétérinaire qu'autant qu'elle met en lumière le comportement et la tendance pathogène naturelle des microbes; réciproquement, toute classification basée sur les seuls caractères biologiques et qui négligerait les notions relatives au pouvoir pathogène des microbes et aux conditions épidémiologiques du développement de la maladie, resterait sans valeur aux yeux du pathologiste ou de l'hygiéniste qui s'occupe de prophylaxie. C'est pourquoi il nous semble que de telles méthodes de différenciation trouvent leur justification, comme nous l'avons déjà dit, dans le rapport qu'elles établissent entre l'aptitude pathogène du microbe et l'épidémiologie de la maladie qu'il a produite.

Faire la preuve expérimentale du pouvoir pathogène spécifique de n'importe quel groupe important de souches sur les animaux domestiques ordinaires, abstraction faite des singes — en supposant que cet animal montrerait le degré d'infection pour l'homme — n'est évidemment pas chose réalisable. En l'absence d'une telle preuve, nous tenons pour la meilleure, en dépit de ses limites et des erreurs possibles, celle qui consiste à comparer les classifications de laboratoire avec les recherches épidémiologiques, telles que la distribution géographique, le porteur du germe microbien, et l'animal réservoir qui fut à l'origine de la dissémination de la maladie.

Voici les classifications qu'une enquête rigoureuse nous a permis de faire :

Sans entrer dans des minuties géographiques, nous pouvons dire que toutes les souches isolées dans les départements du Nord, de l'Ouest et du Centre de la France ont été classées comme *Br. abortus bovis*; dans les départements du Sud-Est et du Sud-Ouest, toutes, sauf 4, comme *melitensis*. Ces quatre exceptions — apparentes seulement — concernent des vaches des deux départements qui sont hors de la zone où sévit l'infection endémique des chèvres et des brebis et où la fièvre ondu-lante humaine ne semble pas exister pour le moment. Dans les départements de l'Est, nous avons trouvé à la fois *abortus* et *melitensis*. Quoique le nombre de souches examinées soit encore trop petit pour permettre une conclusion définitive, on peut cependant voir, dans cette répartition géographique, une

suggestion intéressante, puisqu'elle correspond à des régions où prédomine généralement l'élevage du gros bétail ou des chèvres et brebis. Dans les zones de transition ou mixtes représentées par les départements de l'Est, on trouve les deux types de *Brucella*.

Par rapport à leur origine animale, nous notons que toutes les souches d'origine bovine, sauf 3, ont été classées comme *abortus*. Ces 3 exceptions (1) — classées comme *Br. melitensis* — offrent un réel intérêt : aussi devons-nous les présenter avec quelques détails.

Dans les deux cas il y a coexistence et corrélation de maladie animale et humaine. En Meurthe-et-Moselle (2) 2 malades, et dans la Drôme (3), 3 malades ont été respectivement en contact avec les vaches infectées. Aucun de ces sujets — une enquête minutieuse l'a établi — n'a eu d'autres rapports avec d'autres animaux (chèvres et brebis) : aussi peut-on conclure que les vaches ont été l'unique source de l'infection humaine.

La présence de plusieurs cas de maladie humaine dans chacune des fermes est la preuve du degré de virulence du germe *Br. melitensis* (l'hémoculture des malades a donné un *Brucella* également classé comme *melitensis*).

Enfin, l'avortement épizootique a sévi chez les chèvres et les brebis dans le voisinage de la vache infectante de Meurthe-et-Moselle (plusieurs d'entre elles ont donné une agglutination positive et du sang de l'une de ces brebis nous avons isolé *Br. melitensis*).

Dans la ferme de la Drôme il y avait aussi un troupeau de brebis chez lesquelles nous avons pu démontrer l'infection méconnue par *Br. melitensis* non seulement par l'agglutination, mais, là encore, par l'isolement d'un germe du type *melitensis* dans le sang d'un de ces animaux : l'ensemble de ces constatations explique et justifie la découverte de *Br. melitensis* dans l'organisme des vaches.

(1) Deux de ces souches proviennent de la même étable (Drôme) et concernent les mêmes cas humains.

(2) Une observation sur l'infection de cette vache et les deux cas humains associés a été publiée par Parisot, Vidal et Lévy. *Revue d'Hygiène*, 15, n° 7, 1932.

(3) Une publication détaillée sur ces cas paraîtra ultérieurement dans une étude épidémiologique.

Les chèvres dont nous avons pu réussir les hémocultures viennent de la région du Sud où l'affection est endémique; comme on pouvait s'y attendre, elles sont toutes classées comme *Br. melitensis*.

La même remarque s'applique aussi aux brebis, à une exception près. Il s'agit, dans ce cas, d'une souche *abortus bovis* isolée d'une brebis par le Professeur Rinjard et sur laquelle nous n'avons aucun document épidémiologique. L'animal vivait dans la région du Nord (Pas-de-Calais) où prédomine le gros bétail. Les vaches sont ici infectées par *Br. abortus bovis*, et sans doute infectent la brebis avec ce type de microbe.

Les souches équines sont classées comme *Br. abortus*; elles viennent de départements où se pratique surtout l'élevage de gros bétail, et où, à notre connaissance, aucun *Br. melitensis* n'a encore été différencié.

La plupart des souches humaines viennent de la région endémique du Sud, et se comportent toutes comme *Br. melitensis*.

Parmi les souches isolées dans l'Est, classées comme *Br. melitensis*, l'une vient de la Moselle, 8 de la Meurthe-et-Moselle et 1 du Bas-Rhin.

La première, que nous devons à l'obligeance du Professeur Lemierre, concerne un cas où l'origine ovine paraît certaine (1).

Celles de Meurthe-et-Moselle ont été isolées d'agglomérations très voisines les unes des autres, où les brebis et les chèvres étaient infectées par *Br. melitensis*, comme nous nous en sommes rendu compte. Trois de ces cas avaient cependant pour origine une contamination par les vaches qui, elles-mêmes, avaient été fort probablement infectées par les chèvres ou les brebis.

Le cas observé dans le Bas-Rhin concernait un berger qui soignait un troupeau de moutons où s'étaient produits des avortements.

Deux souches humaines sont classées comme *abortus*. C'est là la découverte la plus intéressante de notre étude.

(1) LEMIERRE et MAHOUDAU-CAMPOYER. *Société médicale des Hôpitaux de Paris* 4 mars 1932, p. 319.

L'une provient d'un homme (1) dont la profession consiste à acheter et à engraisser des animaux avant de les revendre pour la boucherie. Par ses occupations, il s'est trouvé en contact avec une grande quantité d'animaux qui, depuis, ont été abattus sans qu'il ait pu en être fait d'examen. Toutefois, quelques semaines avant de tomber malade, il avait aidé à délivrer une vache qui avait mis bas prématurément; il semble bien que ce fut là la source de son infection.

La seconde fut isolée du sang d'un fermier qui possédait 30 vaches. 17 d'entre elles avaient avorté pendant les douze mois précédant l'examen. Il avait été en contact continu avec ces animaux et les avait soignés au moment des avortements. Il n'avait eu aucun contact avec des chèvres ou des brebis.

Ces 2 cas, autant que nous le sachions, sont *les premiers en France dans lesquels des souches humaines de Brucella ont été isolées et identifiées comme Br. abortus bovis*.

En groupant ces divers éléments d'observation, il apparaît que les classifications que nous avons faites des souches de *Brucella* correspondent bien au type que la source animale pouvait faire prévoir, et que les quelques exceptions constatées s'expliquent aisément par le contact des animaux infectés avec une autre espèce animale, comme c'est le cas des trois vaches qui ont donné *Br. melitensis* et de la brebis qui a donné un *abortus bovis*.

Notre classification, admise comme correcte, montre qu'en France l'infection du type *abortus* bovin s'observe surtout dans le Nord, l'Ouest et le Centre; celle de type *Br. melitensis* dans le Sud-Est et le Sud-Ouest, et qu'il existe une zone mixte (départements de l'Est) où l'on trouve un mélange des deux. Le *Br. melitensis* est de beaucoup le type le plus fréquent de l'infection humaine; mais en France, comme c'est le cas dans d'autres pays, *Br. abortus* peut être aussi pathogène pour l'homme.

CONCLUSIONS.

1° Cent quatre-vingt-onze souches de *Brucella* isolées en

(1) Ce cas a été diagnostiqué par le Dr Vêrain et le Centre en a été avisé par le Professeur Parisot. C'est ainsi qu'il a pu être enquêté par le Dr L. Vidal et l'hémoculture effectuée.

France ont été classées par l'étude de trois caractères biologiques :

a) Action bactériostatique de substances colorantes (en particulier thionine et fuchsine basique);

b) Dégagement d'H₂S;

c) Nécessité, pour les souches récemment isolées, d'une atmosphère enrichie en CO₂.

2° Il a été possible de classer 187 de ces 191 souches par l'action bactériostatique des colorants en un ou deux types (1) :

a) Celles qui poussent à la fois sur les milieux en fuchsine basique et thionine, considérées comme *melitensis*;

b) Celles qui poussent en fuchsine basique, mais qui sont inhibées par les milieux à thionine, considérées comme *abortus bovis*.

Quatre souches étaient, semblait-il, d'un type intermédiaire et n'ont pu être étiquetées par cette méthode.

3° Il y a de fortes présomptions pour qu'un germe n'appartienne pas à la variété *Br. melitensis* lorsque sa culture dégage H₂S pendant une période de plusieurs jours, et que la souche récemment isolée réclame la présence de CO₂ pour son développement.

4° En tenant compte de leur comportement vis-à-vis de ces méthodes de laboratoire (action bactériostatique des colorants, production d'H₂S et besoin de CO₂) 129 des 131 souches d'origine humaine ont été classées comme *Br. melitensis* et 2 comme *Br. abortus*.

Des 41 souches bovines, 38 sont classées comme *Br. abortus bovis* et 3 comme *Br. melitensis*.

Des 10 souches ovines, 9 sont classées comme *Br. melitensis* et 1 comme *Br. abortus bovis*.

Six souches caprines sont classées comme *Br. melitensis* et 3 souches équines comme *Br. abortus bovis*.

5° Ces classifications répondent à ce que l'on pouvait attendre, eu égard, d'une part, à notre connaissance de l'hôte immédiat qui avait hébergé l'organisme microbien, et d'autre

(1) 142 de ces souches ont été adressées au Dr Huddleson qui les a soumises aux mêmes épreuves et a trouvé des résultats identiques en tous points aux nôtres.

part aux observations épidémiologiques concernant le réservoir animal probable.

6° Ces classifications, tenues pour exactes, démontrent que la variété *Br. melitensis* prédomine dans les départements du Sud, le *Br. abortus bovis* dans ceux du Nord, de l'Ouest et du Centre, et les deux variétés peuvent se rencontrer dans certains départements de l'Est de la France.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] EVANS (Alice). *Journal of Infectious Diseases*, **22**, 1918, p. 560.
- [2] WILSON (G. S.). *Bulletin of Hygiene*, vol. VI, n° 5, mai 1931.
- [3] HUDDLESON (I.), FOREST. *Michigan Technical Bulletin*, n° 100, août 1929.
- [4] HUDDLESON (I.), FOREST. *American Journal of Public Health*, vol. XXI, n° 5, mai 1931.
- [5] KRISTENSEN, MARTIN. *II^e Congrès international de Pathologie comparée*, 1931, p. 68.
- [6] WILSON (G. S.). *British Journal of Experimental Pathology*, **13**, 1932, p. 1.
- [7] PANDIT (S. R.) et WILSON (G. R.). *The Journal of Hygiene*, vol. XXXII, n° 1, janvier 1932.
- [8] MC ALPINE (J. G.) et SLANETZ (C. A.). *Journal of Infectious Diseases*, vol. XLII, 1928, p. 73.
- [9] KRISTENSEN (M.) et PER HOLM. *Centralblatt f. Bakteriologie, Parasitenkunde u. Infektionskrankheiten*, **112**, 1929.
- [10] FRANCIS (Edward). *U. S. Public Health Reports*, vol. XLVI, n° 41, 4 octobre 1931.

LES AGGLUTINOGENES DU VIBRION SEPTIQUE

VALEUR COMPARATIVE

DU SÉRUM ANTI-O ET DU SÉRUM ANTITOXIQUE

par M. WEINBERG, J. DAVESNE et P. HABER.

E. Weil et A. Felix (1917) ont isolé de vieilles cultures sur gélose inclinée de *B. proteus vulgaris* (souches X₂ et X₁₉) deux races morphologiques qu'ils ont désignées comme types O et H. Les colonies H sont recouvertes d'un voile transparent, alors que les colonies O restent compactes.

Les sérums préparés avec ces deux types morphologiques ont des propriétés différentes : le sérum anti-O agglutine l'antigène O en petits granules, et le sérum anti-H agglutine à la fois l'antigène H en gros flocons et l'antigène O en petits granules.

Divers auteurs, H. Braun et H. Schaeffer (1919), Sachs et Schlossberger (1919), F. Schiff (1922), entre autres, ont confirmé les constatations de Weil et Felix. Les types O et H ont été signalés chez d'autres espèces microbiennes : b. typhique, b. paratyphiques, b. de Gaertner, b. dysentérique.

En 1926, A. Felix et L. Olitzki ont trouvé que le pouvoir bactéricide des sérums spécifiques (anti-Gaertner, antityphique, antiparatyphiques) est dû uniquement à l'anticorps O.

Dans des recherches ultérieures, effectuées tant *in vitro* qu'*in vivo*, A. Felix et M. Robertson (1928) et M. Robertson et A. Felix (1930) ont signalé l'existence de ces deux antigènes O et H dans des espèces microbiennes anaérobies (*V. septique* et b. tétanique) et précisé l'action des sérums préparés avec ces deux types différents.

De leurs recherches *in vitro* (1928), ils ont conclu que les propriétés des agglutinogènes O et H, constatés chez les microbes anaérobies, étaient identiques aux propriétés des agglutinogènes O et H des microbes aérobies. L'agglutinogène H est facilement détruit ; il ne résiste pas à l'action de la chaleur, ni à

celle de l'alcool ou d'une solution acide ou alcaline. L'agglutinogène O résiste au contraire à ces divers facteurs. Il n'est pas détruit après deux heures de chauffage à 100°.

Avec un sérum anti-O obtenu sur cheval, M. Robertson et A. Felix ont étudié sur la souris (1930) le pouvoir préventif contre l'injection d'un mélange mortel de spores de *V. septique* et de chlorure de calcium, et ils ont constaté que l'injection préalable de ce sérum protégeait la souris contre l'infection provoquée, alors qu'un sérum antitoxique ne protégeait qu'une partie des animaux injectés.

Il était évident que les faits signalés par A. Felix et M. Robertson étaient d'une extrême importance au point de vue sérothérapique. Leur confirmation aurait entraîné des modifications notables dans la technique actuelle de préparation des sérums antimicrobiens.

Aussi avons-nous d'abord répété leurs expériences en ce qui concerne le *Vibron septique*.

Voici les résultats de nos recherches :

I. — PRÉPARATION DES SÉRUMS.

Les sérums ont été préparés sur le lapin et sur le cheval.

A. LAPINS. — Nos animaux ont reçu par voie intraveineuse, à quatre ou cinq jours d'intervalle, des doses croissantes d'antigène, de 1, 10 de centimètre cube à 4 ou 5 cent. cubes. Ils ont été répartis en 4 lots; ceux du premier lot ont été injectés avec des microbes vivants (culture de vingt-quatre heures, centrifugée et reprise par l'eau physiologique); ceux du deuxième lot avec des microbes chauffés à 100° suivant la technique de A. Felix et M. Robertson (1); ceux du troisième lot avec des microbes provenant d'une culture de quarante-huit heures centrifugée, lavée deux fois à l'eau distillée stéri-

(1) La culture de quarante-huit heures est centrifugée, lavée deux fois à l'eau distillée fraîche stérilisée. Le culot d'un litre de culture est concentré dans 50 cent. cubes d'eau distillée stérilisée. Cette suspension est chauffée à l'autoclave une heure à 100°. On centrifuge et on reprend le culot dans 50 cent. cubes d'eau physiologique. On chauffe ensuite deux fois une demi-heure à 100° à vingt-quatre heures d'intervalle. Au moment de l'emploi, cette solution-mère est ramenée au volume primitif par addition d'eau physiologique.

TABLEAU I. — Epreuve d'agglutination des sérums préparés avec les microbes vivants (1).

SÉRUM	ANTIGÈNE microbes vivants	ANTIGÈNE C	ANTIGÈNE microbes chauffés à 100°	ANTIGÈNE microbes chauffés à 120°
C4.	1 p. 1.300 (g. f.)	1 p. 1.400 (p. f.)	1 p. 2.500 (p. f.)	1 p. 1.300 (p. f.)
C31	1 p. 200 (g. f.)	1 p. 700 (p. f.)	1 p. 900 (p. f.)	1 p. 400 (p. f.)
C33	1 p. 200 (g. f.)	1 p. 100 (p. f.)	1 p. 200 (p. f.)	1 p. 200 (p. f.)
C1.	1 p. 150 (g. f.)	1 p. 250 (p. f.)	1 p. 400 (p. f.)	1 p. 300 (p. f.)
C2.	1 p. 400 (g. f.)	1 p. 250 (p. f.)	1 p. 1.500 (p. f.)	1 p. 350 (p. f.)
C35	1 p. 800 (g. f.)	1 p. 1.000 (p. f.)	1 p. 1.000 (p. f.)	1 p. 800 (p. f.)
C36	1 p. 600 (g. f.)	1 p. 1.000 (p. f.)	1 p. 1.000 (p. f.)	1 p. 800 (p. f.)

lisée, dont le culot, concentré en 50 cent. cubes d'eau physiologique, a été chauffé à l'autoclave quinze minutes à 120°; ceux du quatrième lot avec des microbes préparés suivant la technique de A. Felix et R. Robertson, avec cette différence que ces microbes ont été obtenus à partir de cultures totales, chauffées avant centrifugation. Cet antigène est désigné dans nos tableaux sous le nom d'antigène C.¹

B. CHEVAUX. — Deux chevaux ont été préparés avec l'antigène de M. Robertson et A. Felix.

Le cheval 335, que nous avons utilisé d'abord, avait déjà reçu trois injections (2 c. c. 5, 5 cent. cubes et 7 c. c. 5) de culture chauffée deux jours de suite pendant une heure à 100°. Comme son sérum n'agglutinait, huit jours après la troisième injection, que l'antigène O (légèrement), nous l'avons utilisé pour la préparation du sérum anti-O, préparé d'après la technique de M. Robertson et A. Felix. Ce cheval a reçu, du 30 mars au 4 juillet 1931, quatorze injections de doses croissantes (de 1 à 50 cent. cubes d'émulsion-mère) d'antigène O, en tout 231 cent. cubes, qui correspondent à 2 litres, 310 cent. cubes de culture.

(1) Dans ce tableau, comme dans tous les autres, g. f. signifie : gros flocons et p. f. : petits flocons.

Le cheval 339 a été injecté toutes les semaines, du 16 mai 1931, à raison de 1/2, 3, 5, 8, 10, 15, 20, 30, 40 et 50 cent. cubes d'émulsion-mère diluée en eau physiologique, soit 181 c. c. 5, représentant 1 litre, 815 cent. cubes de culture.

Comme pour le cheval 335, l'antigène a été préparé d'après la méthode de A. Felix et M. Robertson. Mais nous avons repris le culot des microbes préparés et centrifugés avec 50 cent. cubes d'eau physiologique et 50 cent. cubes de glycérine pure. Cette émulsion fut conservée à la glacière.

Nous avons étudié le pouvoir agglutinant des sérums obtenus avec les résultats suivants qui ont été notés après cinq heures d'étuve à 37°.

I. Le tableau I montre que les sérums préparés sur lapins avec les microbes vivants contiennent les deux agglutinines (H et O). L'action de l'agglutinine O, dans l'épreuve avec les microbes vivants, caractérisée par la formation de fins grumeaux, est plus nette dans les tubes contenant du sérum très dilué et dans lesquels l'agglutination se fait plus lentement.

Les 7 sérums obtenus ont donné des résultats tout à fait différents, même en présence du même antigène. Ainsi, avec les microbes vivants, le titre agglutinant varie de 1 p. 150 à 1 p. 1.300; avec l'antigène C : de 1 p. 400 à 1 p. 1.400; avec les microbes chauffés à 100° : de 1 p. 200 à 1 p. 2.500; avec les microbes chauffés à 120° : de 1 p. 200 à 1 p. 1.300.

Si nous comparons maintenant les résultats obtenus pour un même sérum étudié avec les 4 antigènes différents, nous trouvons qu'un seul sérum (C 33) a donné le même taux agglutinant (1 p. 200) avec les microbes vivants (H) qu'avec les microbes chauffés (O); les 6 autres ont agglutiné beaucoup plus fortement l'antigène O que l'antigène H; le sérum C 4, qui agglutine les microbes vivants à 1 p. 1.300, agglutine les microbes chauffés à 100°, à 1 p. 2.500.

Avec l'antigène C, et les microbes stérilisés à 120°, on a obtenu à peu près les mêmes résultats qu'avec les microbes vivants.

II. Le tableau II donne les résultats obtenus avec les sérums préparés sur lapin avec l'antigène O. Les 6 premiers sérums ont agglutiné l'antigène O de 1 p. 400 à 1 p. 700, aucunement

les microbes vivants, et faiblement l'antigène C et les microbes chauffés à 120°. Les 4 sérums, dont le pouvoir anti-O est le plus fort (de 1 p. 1.000 à 1 p. 1.100), agglutinent à peine les microbes vivants en gros flocons (3 à 1 p. 10 et 1 à 1 p. 100). Ces 4 sérums agglutinent l'antigène C et aussi très légèrement (en fins grumeaux) les microbes stérilisés à 120°.

TABLEAU II. — **Epreuve d'agglutination des sérums préparés avec les microbes chauffés à 100°.**

SÉRUM	ANTIGÈNE microbes vivants	ANTIGÈNE C	ANTIGÈNE microbes chauffés à 100°	ANTIGÈNE microbes chauffés à 120°
C14		1 p. 50 (p. f.)	1 p. 400 (p. f.)	1 p. 10 (p. f.)
C15		1 p. 50 (p. f.)	1 p. 700 (p. f.)	1 p. 40 (p. f.)
C16		1 p. 100 (p. f.)	1 p. 400 (p. f.)	
C27		1 p. 100 (p. f.)	1 p. 600 (p. f.)	
C29		1 p. 100 (p. f.)	1 p. 700 (p. f.)	1 p. 50 (p. f.)
C13		1 p. 350 (p. f.)	1 p. 400 (p. f.)	1 p. 450 (p. f.)
C10	1 p. 10 (g. f.)	1 p. 50 (p. f.)	1 p. 1.100 (p. f.)	1 p. 10 (p. f.)
C41	1 p. 100 (g. f.)	1 p. 200 (p. f.)	1 p. 1.100 (p. f.)	1 p. 25 (p. f.)
C42	1 p. 10 (g. f.)	1 p. 100 (p. f.)	1 p. 1.000 (p. f.)	1 p. 10 (p. f.)
C43	1 p. 10 (g. f.)	1 p. 250 (p. f.)	1 p. 1.100 (p. f.)	1 p. 10 (p. f.)

III. Les sérums préparés sur lapin avec l'antigène C agglutinent en fins grumeaux aussi bien l'antigène O que l'antigène C. Ils agglutinent aussi fortement les microbes stérilisés à 120°, et plus légèrement (1 à 1 p. 150 et 3 à 1 p. 500) les microbes vivants en gros flocons. Nous croyons que cette agglutination assez forte des microbes vivants est surtout favorisée par la présence dans ces sérums de précipitines. Parmi ces 4 sérums, 3 ont précipité de 1 p. 10 à 1 p. 25 le filtrat d'une culture non chauffée. Cependant, le quatrième sérum n'a montré aucun pouvoir précipitant, même à 1 p. 10 (tableau III).

IV. Les sérums préparés sur lapin avec les microbes chauffés

à 120° sont presque aussi actifs vis-à-vis de leur propre antigène que vis-à-vis des microbes chauffés à 100°, ce qui montrerait qu'il s'agit ici du même antigène O supportant cette haute température. Ils renferment également une petite quantité d'agglutinine H (tableau IV).

V. Les deux sérums préparés sur cheval, avec les microbes chauffés à 100°, renferment l'agglutinine O et aussi une quantité notable d'agglutinine H (tableau V). Il faut cependant signaler que le sérum du cheval 339 (1) agglutinait, avant l'immunisation, aussi bien les microbes vivants que les microbes chauffés à 100° à un taux très faible (1 p. 30).

II. — POUVOIR PRÉVENTIF DU SÉRUM ANTI-O.

Nous avons suivi rigoureusement la technique de M. Robertson et A. Felix que nous allons rappeler brièvement. On prépare les souris en leur injectant dans une cuisse 1 cent. cube de sérum. Deux jours plus tard, on injecte dans l'autre cuisse un mélange mortel de chlorure de calcium à 3 p. 100 et de spores de V. septique. La quantité totale injectée est de 0 c. c. 7 (1/4 de centimètre cube de chlorure de calcium + 1/4 de centimètre cube de spores + 0 c. c. 2 d'eau physiologique). Les spores sont obtenues de la façon suivante : une culture de quarante-huit heures est centrifugée, lavée 4 fois dans l'eau distillée stérilisée. On décante; on reprend le culot dans un peu d'eau distillée. On peut ainsi conserver ainsi les spores à la glacière pendant quelques jours. Avant l'emploi, on chauffe pendant une heure à 78-79°; puis on décante et on reprend le culot par l'eau physiologique.

Nous avons étudié les sérums des deux chevaux, 335 et 339, avec les résultats suivants (1) :

Dans des expériences préliminaires, nous avons vérifié l'innocuité de la solution de chlorure de calcium et des spores

(1) Pour nous assurer que nous avons fait nos expériences avec un sérum aussi actif vis-à-vis de l'antigène O que celui qui a servi aux expériences de M. Robertson et A. Felix, nous avons demandé à ce dernier de bien vouloir étudier lui-même le pouvoir agglutinant du sérum 339. M. Felix a trouvé un chiffre inférieur à celui indiqué par nous, mais à peu près égal à celui du sérum préparé par ces auteurs. Ces différences doivent être mises sur le compte de la différence des techniques employées.

TABLEAU III. — Epreuve d'agglutination des sérums préparés avec l'antigène C.

SÉRUM	ANTIGÈNE microbes vivants	ANTIGÈNE C	ANTIGÈNE microbes chauffés à 100°	ANTIGÈNE microbes chauffés à 120°
C9.	1 p. 500 (g. f.)	1 p. 1.000 (g. + p. f.)	1 p. 1.400 (p. f.)	1 p. 900 (p. f.)
C10.	1 p. 500 (g. f.)	1 p. 1.000 (g. + p. f.)	1 p. 1.400 (p. f.)	1 p. 900 (p. f.)
C6.	1 p. 50 (g. f.)	1 p. 450 (g. + p. f.)	1 p. 900 (p. f.)	1 p. 500 (p. f.)
C5.	1 p. 500 (g. f.)	1 p. 1.100 (g. + p. f.)	1 p. 900 (p. f.)	1 p. 800 (p. f.)

TABLEAU IV. — Epreuve d'agglutination des sérums préparés avec les microbes chauffés à 120°.

SÉRUM	ANTIGÈNE microbes vivants	ANTIGÈNE C	ANTIGÈNE microbes chauffés à 100°	ANTIGÈNE microbes chauffés à 120°
C21.	1 p. 100 (g. + p. f.)	1 p. 500 (p. f.)	1 p. 1.000 (p. f.)	1 p. 800 (p. f.)
C25.	1 p. 100 (g. + p. f.)	1 p. 500 (p. f.)	1 p. 1.000 (p. f.)	1 p. 800 (p. f.)
C26.	1 p. 200 (g. + p. f.)	1 p. 700 (p. f.)	1 p. 1.000 (p. f.)	1 p. 1.000 (p. f.)
C44.	1 p. 100 (g. + p. f.)	1 p. 700 (p. f.)	1 p. 900 (p. f.)	1 p. 1.000 (p. f.)
C45.	1 p. 100 (g. + p. f.)	1 p. 600 (p. f.)	1 p. 800 (p. f.)	1 p. 1.000 (p. f.)
C46.	1 p. 10 (g. + p. f.)	1 p. 700 (p. f.)	1 p. 900 (p. f.)	1 p. 1.000 (p. f.)
C47.	1 p. 10 (g. + p. f.)	1 p. 700 (p. f.)	1 p. 900 (p. f.)	1 p. 1.000 (p. f.)

TABLEAU V. — Epreuve d'agglutination des sérums préparés sur cheval avec les microbes chauffés à 100°.

SÉRUM	ANTIGÈNE microbes vivants	ANTIGÈNE microbes chauffés à 100°	ANTIGÈNE C	ANTIGÈNE microbes chauffés à 120°
Cheval 333. . . .	1 p. 700 (g. f.)	1 p. 3.700 (p. f.)	1 p. 2.450 (p. f.)	1 p. 900 (p. f.)
Cheval 339. . . .	1 p. 600 (g. f.)	1 p. 3.700 (p. f.)	1 p. 2.150 (p. f.)	1 p. 700 (p. f.)

injectées seules, et nous avons déterminé la dose mortelle du mélange chlorure de calcium + spores.

Le chlorure de calcium, injecté à la dose de 1/4 de centimètre cube, n'a provoqué aucune réaction chez 5 souris injectées.

Chez cinq lots de 3 souris, injectées respectivement avec 1/20.000, 1/10.000, 1/1.000, 1/500, 1/100 de centimètre cube de spores, il n'y a eu aucune mortalité. De même, les animaux injectés avec 1/4 de centimètre cube de la dilution mère de spores n'ont présenté aucune lésion.

Pour déterminer la dose mortelle du mélange de chlorure de calcium et de spores, la dose fixe de chlorure de calcium (0 c. c. 25 à 3 p. 100) a été mélangée à 1/20.000, 1/10.000, 1/1.000, 1/500, et 1/100 et 1/4 de centimètre cube de spores (chaque dose de spores ramenée à un volume de 0 c. c. 25). Nous avons constaté que pour produire la mort de l'animal il fallait employer au moins 1/40 c. c. de notre émulsion de spores (1).

Cheval 339. — Nos diverses expériences sur le pouvoir préventif du *sérum 339*, sont indiquées dans les tableaux VI à X.

TABEAU VI. — Pouvoir préventif. *Sérum 339*.

SOURIS injectées	INJECTION de sérum en cent. cube	INJECTION CaCl + spores en cent. cube	DILUTION spores	SOURIS MORTES	
				en 24 heures	en 48 heures
5	1	0,7	1 p. 40	3	2
5	1	0,7	1 p. 40	2	2
4 (témoins). . . .		0,7	1 p. 10	4	
5 (témoins). . . .		0,7	1 p. 40	2	3

TABEAU VII. — Pouvoir préventif. *Sérum 339*.

SOURIS injectées	INJECTION de sérum en cent. cube	INJECTIONS CaCl + spores en cent. cube	DILUTION spores	SOURIS MORTES	
				en 24 heures	en 48 heures
6	1	0,7	1 p. 40	1	4
5		0,7	1 p. 40	1	

(1) Nos expériences ont été pratiquées sur des souris de 17 à 20 grammes.

On y voit que plusieurs lots, en tout 42 souris, ont été injectées préventivement avec 1 cent. cube de sérum 339, et ensuite avec des doses variables de spores mélangées à du chlorure de calcium. Dans les premières expériences, 1 souris sur 5 a quelquefois survécu à l'injection d'épreuve. Dans le lot de 10 souris du tableau IX, 8 sont mortes en quarante-huit heures, les 2 autres en soixante-douze heures. Mais, parmi les 11 témoins, 1 souris n'est morte qu'après ce laps de temps. Dans la dernière expérience (tableau X), sur 11 souris préparées, 3 sont mortes en quarante-huit heures et 2 en soixante-douze heures; mais, parmi les 11 témoins, 4 souris seulement sont mortes. Cette expérience n'a pas donné de résultats meilleurs que la précédente.

TABLEAU VIII. — Pouvoir préventif. Sérum 339.

SOURIS injectées	INJECTION de sérum en cent. cube	INJECTION CaCl + spores en cent. cube	DILUTION spores	SOURIS MORTES	
				en 24 heures	en 48 heures
3	1	0,7	1 p. 80	1	3
5		0,7	1 p. 80	3	2

TABLEAU IX. — Pouvoir préventif. Sérum 339.

SOURIS injectées	INJECTION de sérum en cent. cube	INJECTION CaCl + spores en cent. cube	DILUTION spores	SOURIS MORTES		
				en 24 heures	en 48 heures	en 72 heures
10 . . .	1	0,7	1,40	3	5	2
11 . . .		0,7	1,40	7	3	1

TABLEAU X. — Pouvoir préventif. Sérum 339.

SOURIS injectées	INJECTION de sérum en cent. cube	INJECTION CaCl + spores en cent. cube	DILUTION spores	SOURIS MORTES		
				en 24 heures	en 48 heures	en 72 heures
11 . . .	1	0,7	1 p. 80	1	2	2
11 . . .		0,7	1 p. 80	3	1	

Les recherches faites comparativement avec le sérum antitoxique (résumées dans les tableaux XI à XIV) ont donné toutes des résultats concordants : sur 28 souris, divisées en plusieurs lots, injectées préventivement, aucune n'est morte, alors que, parmi les témoins, 4 souris sur 5 sont mortes dans la première expérience, 5 sur 5 dans la deuxième; dans la troisième, 10 sur 11 sont mortes en quarante-huit heures et la dernière en soixante-douze heures. La quatrième expérience ne compte pas, car, sur 11 souris témoins, 4 seulement sont mortes en quarante-huit heures. Cependant, aucune des 11 souris préparées avec le sérum antitoxique n'est morte.

TABLEAU XI. — Pouvoir préventif du sérum antitoxique.

SOURIS injectées	INJECTION de sérum en cent. cube	INJECTION CaCl + spores en cent. cube	DILUTION spores	SOURIS MORTES	
				en 24 heures	en 48 heures
2	1	0,7	1 p. 40	4	
5		0,7	1 p. 40		

TABLEAU XII. — Pouvoir préventif du sérum antitoxique.

SOURIS injectées	INJECTION de sérum en cent. cube	INJECTION CaCl + spores en cent. cube	DILUTION spores	SOURIS MORTES	
				en 24 heures	en 48 heures
4	1	0,7	1 p. 80	3	2
5		0,7	1 p. 80		

TABLEAU XIII. — Pouvoir préventif du sérum antitoxique.

SOURIS injectées	INJECTION de sérum en cent. cube	INJECTION CaCl + spores en cent. cube	DILUTION spores	SOURIS MORTES	
				en 24 heures	en 48 heures
11	1	0,7	1 p. 40	7	3
11 (témoins) . . .		0,7	1 p. 40		

La onzième souris témoin est morte en 72 heures.

TABLEAU XIV. — Pouvoir préventif du sérum antitoxique.

SOURIS injectées	INJECTION de sérum en cent. cube	INJECTION CaCl + spores en cent. cube	DILUTION spores	SOURIS MORTES	
				en 24 heures	en 48 heures
14.	1	0,7	1 p. 80		
11.		0,7	1 p. 80	3	1

TABLEAU XV. — Pouvoir préventif du sérum antitoxique.

SOURIS injectées	INJECTION de sérum en cent. cube	INJECTION CaCl + spores en cent. cube	DILUTION spores	SOURIS MORTES	
				en 24 heures	en 48 heures
6	1 p. 40	0,7	1 p. 40	2	2
6	1 p. 4	0,7	1 p. 40	1	2
6	1 p. 2	0,7	1 p. 40	2	2
6 (témoins).		0,7	1 p. 40	6	

TABLEAU XVI. — Pouvoir préventif. Sérum 335.

SOURIS injectées	INJECTION de sérum en cent. cube	INJECTION CaCl + spores en cent. cube	DILUTION spores	SOURIS MORTES		
				en 24 heures	en 33 heures	en 48 heures
5	1	0,7	1 p. 200		1	1
5	1	0,7	1 p. 300		1	1
5		0,7	1 p. 200	3	1	
5		0,7	1 p. 300	1	1	

TABLEAU XVII. — Pouvoir préventif. Sérum 335.

SOURIS injectées	INJECTION de sérum en cent. cube	INJECTION CaCl + spores en cent. cube	DILUTION spores	SOURIS MORTES		
				en 24 heures	en 48 heures	en + 48 heures
8	1	0,7	1 p. 150		2	1
8	1	0,7	1 p. 200		2	1
8	1	0,7	1 p. 250			2
8		0,7	1 p. 150	5		
8		0,7	1 p. 200	3	4	
8		0,7	1 p. 250	2	1	

Nous avons voulu nous rendre compte de la valeur exacte du pouvoir préventif du sérum antitoxique employé. Le tableau XV montre que, employé à la dose de 1/2 cent. cube, ce sérum n'a protégé que 4 souris sur 6. Il est donc évident que, dans nos recherches sur la valeur comparative du sérum 339 et du sérum antitoxique, ce dernier a été employé à des doses approchant la dose protectrice limite.

Cheval 335. — Le sérum 335 a été étudié avec une nouvelle préparation de spores paraissant plus active que la première. Des deux expériences résumées dans le tableau XVI, celle pratiquée avec les spores à 1 p. 200 donne des résultats en faveur du pouvoir préventif du sérum : 3 souris sur 5 ont été protégées, alors que, parmi les 5 témoins, 4 sont mortes. Les expériences suivantes (tableau XVIII) faites avec 1 p. 150 et 1 p. 200 de centimètre cube de spores ont donné des résultats comparables : 5 souris sur 8 ont été protégées, alors que, parmi les souris témoins, 1 seule sur 8 a survécu. La dernière expérience, faite avec 1 p. 250 de centimètre cube de spores, n'est pas significative, puisque, si 6 souris sur 8 ont été protégées par le sérum, 3 témoins seulement sur 8 sont mortes.

TABLEAU XVIII. — Pouvoir antitoxique. Sérum 339.

SOURIS injectées	DOSE de sérum en cent. cube	INJECTION de toxine	SOURIS MORTES en 12 heures
3	0,01	1 dose mortelle.	3
3	0,25	1 dose mortelle.	3
3		1 dose mortelle.	3

TABLEAU XIX. — Pouvoir antitoxique. Sérum 335.

SOURIS injectées	DOSE de sérum en cent. cube	INJECTION de toxine	SOURIS MORTES en 12 heures
4	0,25	1 dose mortelle.	4
3	0,01	1 dose mortelle.	3
3		1 dose mortelle.	3

Ces résultats montrent, incontestablement, que le sérum 335 a un pouvoir préventif beaucoup plus net que le sérum 339.

Nous avons voulu voir si le sérum 335 doit ses propriétés protectrices à une petite quantité d'antitoxine. Nous avons étudié le pouvoir neutralisant des deux sérums 335 et 339. 1/4 de centimètre cube de chacun de ces sérums n'a même pas neutralisé *in vitro* une seule dose mortelle de toxine pour la souris.

*
* *

Avant de publier notre mémoire, nous avons tenu à faire quelques nouvelles expériences pour vérifier certains résultats de nos recherches.

Il était d'abord nécessaire de se rendre compte si, conservé dans la glycérine, l'antigène O était aussi favorable à l'immunisation que lorsqu'il est conservé tel quel, à la glacière, pendant quelques jours. Des recherches comparatives, effectuées sur lapins, nous ont montré que les animaux, préparés avec l'antigène O glycérimé, donnaient des sérums d'un pouvoir agglutinant nullement inférieur à celui des lapins préparés avec l'antigène O non glycérimé.

De plus, des expériences supplémentaires ont confirmé que les lapins injectés avec des microbes vivants, donnent un sérum anti-O de titre aussi élevé que les sérums de lapin préparés avec l'antigène O, à des doses égales et pendant le même laps de temps.

C'est ainsi que nous avons immunisé 3 lapins avec des microbes vivants et 4 lapins avec l'antigène O. Ces animaux ont reçu en 6 semaines, en injection intraveineuse, 6 c. c. 85 d'antigène injecté à des doses croissantes, suivant le rythme suivant: 0 c. c. 1, 0 c. c. 25, 0 c. c. 50, 1 c. c., 1 c. c., 1 c. c., 1 c. c., 1 c. c. ; les premières injections avaient été pratiquées à 8 jours d'intervalle, les quatre dernières tous les 4 jours.

Les sérums préparés avec les microbes vivants ont donné les taux agglutinants suivants :

	MICROBES VIVANTS	ANTIGENE O
Lapin B. 69.	1 p. 1.250	1 p. 750
Lapin D. 37.	1 p. 500	1 p. 2.000
Lapin D. 38.	1 p. 750	1 p. 1.500

Les sérums préparés avec l'antigène O ont donné les taux agglutinants suivants :

	MICROBES VIVANTS	ANTIGÈNE O
Lapin L. 492	1 p. 50	1 p. 750
Lapin B. 92	0	1 p. 1.250
Lapin D. 41	1 p. 50	1 p. 1.250
Lapin D. 42	1 p. 250	1 p. 1.750

Dans les expériences précédentes, nous avons vu que le sérum de lapins préparés avec l'antigène O n'agglutine nullement ou très faiblement les microbes vivants.

Ces nouvelles expériences montrent que le sérum de lapins ainsi préparés peut également agglutiner les microbes vivants. Cette expérience est d'autant plus nette que nous avons obtenu des résultats semblables sur des lapins dont le sérum n'agglutinait nullement, avant l'immunisation, ni les microbes vivants, ni l'antigène O.

Ajoutons, pour terminer, qu'il est souvent difficile de dire si l'agglutination ne renferme que des granulations fines, car il nous est arrivé souvent de trouver, dans les tubes renfermant seulement le mélange d'antigène O et de sérum anti-O, de gros flocons ressemblant à s'y méprendre aux flocons des microbes vivants.

Pour éviter le plus possible les erreurs d'interprétation, la lecture des résultats de l'agglutination a été d'abord faite, au cours de nos recherches, par un collaborateur qui n'avait pas effectué la manipulation.

CONCLUSIONS.

1° Nos recherches confirment celles de A. Felix et M. Robertson, quant à l'existence de deux agglutinogènes (H et O) du Vibron septique, à caractères immunologiques différents:

2° Des deux sérums de chevaux immunisés avec l'agglutinogène O, et qui nous ont donné un taux agglutinant à peu près égal, l'un s'est montré presque dépourvu de pouvoir préventif, l'autre a donné des résultats notablement meilleurs. Il est donc très probable qu'en continuant l'immunisation de nos chevaux nous aurions obtenu à la longue un sérum assez actif pour protéger toutes les souris, dans les conditions de nos expériences. Mais, ayant supposé que le sérum de nos chevaux était assez riche en anticorps anti-O pour éprouver son pouvoir pré-

ventil (en raison du taux d'agglutination obtenu, égal à celui signalé par les auteurs anglais dans leurs expériences), nous avons arrêté les injections et versé nos chevaux dans le contingent de ceux qui servent à la préparation du sérum anti-V. septique par le procédé courant.

D'autre part, nous avons pensé inutile de recommencer la préparation de sérum anti-O sur de nouveaux chevaux, nos expériences ayant montré que même si le sérum anti-O protégeait toutes les souris préparées, il ne serait pas meilleur qu'un sérum antitoxique actif. Et l'infériorité du sérum anti-O est d'autant plus grande, qu'il ne protège que contre le type sérologique homologue, alors que le sérum antitoxique est également actif contre tous les types sérologiques de l'espèce V. septique.

3° La connaissance de l'antigène O ne doit entraîner aucune modification de la préparation des sérums antimicrobiens ; d'abord parce que la préparation du sérum anti-O demande beaucoup plus de temps que la préparation du sérum antimicrobien faite avec les microbes vivants, et ensuite, parce que, en immunisant l'animal avec des microbes vivants, on obtient un sérum dont les propriétés anti-O sont au moins aussi marquées, et souvent plus, que celles du sérum purement anti-O.

4° Nos recherches, tout en montrant qu'il est inutile de modifier la préparation des sérums antimicrobiens, ne diminuent en rien l'importance théorique des travaux de M. Robertson et A. Felix, qui ont contribué à préciser le mécanisme intime de l'action préventive de ces sérums.

BIBLIOGRAPHIE

- E. WEIL et A. FELIX, Weitere Untersuchungen über das Wesen der Fleckfieberagglutination. *Wr. klin. Wchschr.*, 1917, p. 1509.
- E. WEIL et A. FELIX, Untersuchungen über die gewöhnlichen Proteusstämmen und ihre Beziehungen zu den X-Stämmen. *Wr. klin. Wchschr.*, 1918, p. 637.
- E. WEIL et FELIX, Ueber die Doppelnatur der Rezeptoren beim Paraty. B. *Wr. klin. Wchschr.*, 1918, p. 986.
- E. WEIL, A. FELIX et F. MITZENMACHER, Ueber die Doppelnatur der Rezeptoren in der Ty-Paraty-Gruppe. *Wr. klin. Wchschr.*, 1918, p. 1226.

- II. BRAUN, Das Wesen der Weil-Felix'schen Reaktion auf Fleckfieber. *Berl. klin. Wchschr.*, 1918, p. 637.
- H. SACHS, Zur Kenntniss der Weil-Felix'schen Reaktion. *D. med. Wchschr.*, 1918, p. 459.
- K. W. JÖTTEN, Vergl. Unters. über d. kult. ü. serol. Verh. gew. u. Fleckfieber-X-Proteusstämmen mit bes. Berücks. ihrer Abspaltungsvarianten. *Berl. klin. Wchschr.*, 1919, p. 270.
- SACHS et SCHLOSSBERGER, Arbeit aus dem Institut f. exp. Therapie, 1919.
- E. WEILL et A. FELIX, Ueber den Doppeltyphus der Rezeptoren in der Ty-Paraty-Gruppe. *Zeitschr. f. Immunitätsforsch.*, **29**, 1920, p. 24.
- M. ROBERTSON, Serological groupings of V. Septique and their relation to the production of toxin. *Journ. of Pathol. and Bact.*, **23**, 1920, p. 153.
- J. A. ARKWRIGHT, Variation in bacteria in relation to agglutination both by salts and by specific serum. *Journ. of Pathol. and Bact.*, **24**, 1921, p. 36.
- F. SCHIFF, Unters. über den Rezeptorenapparat in der Paratyphus gruppe. *Zeitschr. f. Immunitätsforsch.*, **33**, 1922, p. 511.
- A. FELIX, The qualitative receptor analysis in its application to typhoid fever. *Journ. of Immunology*, **9**, 1924, p. 115.
- H. BRAUN et R. NODAKE, Ueber die Rolle des Ekto-und Endoplasmas der Bakt. f. die Serumbakterizidie und für die Phagozytose. *Zentralbl. f. Bakt. Orig.*, **92**, 1924, 429.
- A. FELIX et L. OLITZKI, The qualitative receptor analysis. *Journ. of Immunology*, **11**, 1926, p. 31.
- L. OLITZKI, Agglutinine, komplementbindende und bakterizide Ambozeptoren ü. deren gegens. Beg. i. d. Paraty. B. Grupe. *Zeitschr. f. Immunitätsforsch.*, **46**, 1926, p. 352.
- E. SPRINCUT, Ueber die Rolle des Ekto-ü.-Endoplasmas der Mäuse-typhusbaz. bei Immunitätsreaktionen. *Zeitschr. f. Immunitätsforsch.*, **52**, 1927, p. 25.
- K. HOFMEIER, Ueber die Rolle des Ekto-ü.-Endoplasmas der Ty-baz. bei Immunitätsreaktionen. *Zeitschr. f. Immunitätsforsch.*, **50**, 1927, p. 71.
- H. DEAN, Complement fixation in mixtures of toxin and antitoxin. *Journ. of Pathol. and Bact.*, **30**, 1927, p. 675.
- H. LUBINSKI, Die serolog. bez. zw. Ty-und Gaertner-Bazillen. *Zentralbl. f. Bakt. Orig.*, **106**, 1928, p. 200.
- A. FELIX et M. ROBERTSON, Serol. Studies of the spore-bearing anaerobes. I. The qualitative analysis of the bacterial antigens of B. oedematis maligns (V. septique) and B. Tetani. *Brit. Journ. of exper. Pathol.*, **9**, 1928, p. 6.
- M. ROBERTSON et A. FELIX, Serol. Stud. of the Spore-bearing anaerobes. II. *In vivo* experiments with an « O » immune serum to vibron septique devoid of antitoxine content. *Brit. Journ. of exper. Pathol.*, **19**, 1930, p. 14.
- A. FELIX, The qualitative serum diagnosis of enteric fevers. *Lancet*, **1**, 1930, p. 505.
- M. WEINBERG, J. DAVESNE et P. HABER. Sérum anti-Vibron-septique anti-O ; son pouvoir préventif. *C. R. Soc. Biol.*, **109**, 1932, n° 10, p. 841.

ACTION DES HUILES D'OLIVE ET DE FOIE DE MORUE SUR LA TUBERCULOSE EXPÉRIMENTALE DU COBAYE ET DU LAPIN

par L. NÈGRE.

Des matières grasses comme l'huile de foie de morue, l'huile de colza, l'huile d'olive, sont depuis longtemps préconisées dans le traitement de la phthisie. Cependant, certains auteurs ont observé que la tuberculose expérimentale évolue plus rapidement chez les cobayes traités par des injections sous-cutanées d'huile cholestérinée (L. Jullien) et chez les lapins soumis à des ingestions répétées d'huile de foie de morue (Troteanu). Ayant nous-même constaté avec Boquet que les substances ciro-graisseuses du bacille de Koch ont le pouvoir d'activer le processus tuberculeux des animaux de laboratoire expérimentalement infectés, nous avons pensé qu'il serait intéressant de préciser l'action de matières grasses comme l'huile d'olive et l'huile de foie de morue sur la tuberculose du cobaye et du lapin. Nous avons choisi comme objet d'étude ces deux huiles parce que la première est communément employée soit dans l'alimentation, soit en thérapeutique, comme véhicule de certaines substances médicamenteuses, et que la seconde est considérée comme un agent actif de traitement de certaines formes locales et torpides de la tuberculose.

Action de l'huile d'olive.

1° PAR VOIE SOUS-CUTANÉE.

EXPÉRIENCE I. — Onze cobayes sont inoculés sous la peau de l'aîne droite le 2 octobre 1930 avec 0 mgr. 0001 de la souche bovine Vallée. Sept d'entre eux sont traités deux fois par semaine par injection sous-cutanée de 1 cent. cube d'huile d'olive pure stérilisée. Quatre sont conservés comme témoins.

Deux cobayes traités et deux témoins meurent prématurément. Un cobaye traité, mort le 14 novembre, présente de gros ganglions inguinaux et sous-

lombaires droits caséux, une rate criblée de tubercules et quelques granulations sur le foie et les poumons. Les quatre cobayes traités et les deux témoins survivants sont sacrifiés le 17 novembre. Les premiers ont, avec de grosses lésions ganglionnaires, de très nombreux tubercules sur la rate. Les deux témoins présentent des ganglions bien moins hypertrophiés et de rares tubercules sur la rate.

EXPÉRIENCE II. — Le 21 mai 1931, douze cobayes reçoivent sous la peau de l'aîne droite 0 milligr. 0001 de la souche bovine Vallée. Six sont traités du 23 mai au 7 juillet par des injections sous-cutanées bi-hebdomadaires de 1 cent. cube d'huile d'olive stérilisée et six sont conservés comme témoins.

Deux cobayes et trois témoins meurent prématurément. Le 9 juillet,

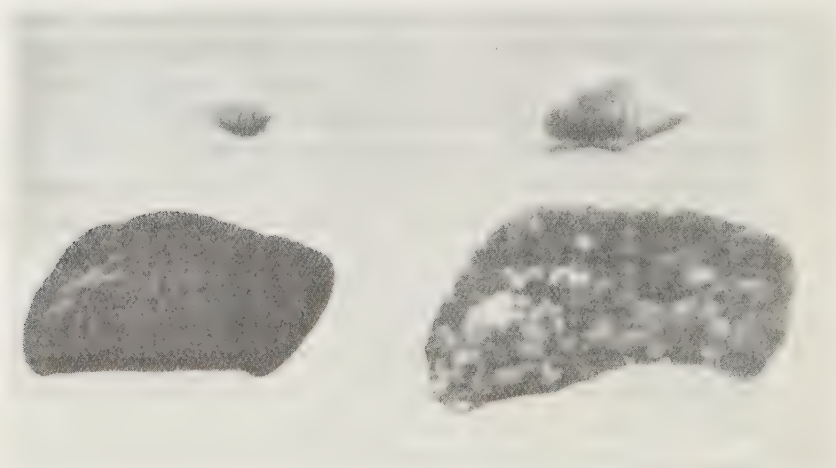


FIG. 1. — A gauche, ganglion sous-lombaire et rate d'un cobaye témoin de l'expérience II. A droite, ganglion sous-lombaire et rate d'un cobaye traité dans la même expérience.

on constate que tous les traités ont subi des chutes de poids de 100 à 200 grammes, alors que les témoins ont légèrement engraisé ou sont demeurés stationnaires. Le même jour, tous ces animaux sont sacrifiés. Les lésions ganglionnaires des cobayes traités sont beaucoup plus prononcées que celles des témoins, spécialement celles des ganglions sous-lombaires. Leurs rates sont criblées de tubercules, alors que ceux-ci sont rares sur les mêmes organes des témoins. Les poumons et le foie des cobayes traités présentent quelques granulations, alors qu'on n'en trouve pas sur les organes correspondants des témoins.

	Traités :	
	3 JUIN (grammes)	4 JUILLET (grammes)
N° 1	745	525
N° 2	550	420
N° 3	465	400

<i>Non traités :</i>			
N° 1		430	435
N° 2		590	600
N° 3		575	575

Le même essai a été effectué chez le lapin.

EXPÉRIENCE III. — Six lapins sont inoculés le 16 décembre 1931 dans la veine avec 1/5000 milligr. de la souche bovine Vallée.

Deux sont conservés comme témoins. Quatre sont traités deux fois par semaine par des injections sous-cutanées de 1 cent. cube d'huile d'olive stérilisée.

Deux lapins traités meurent prématurément. Les quatre autres sont sacrifiés le 4 février 1932. Les deux lapins soumis aux injections d'huile d'olive ont des lésions pulmonaires plus nombreuses et plus étendues que celles des témoins. Mais, comme chez ces derniers, le foie, la rate et les reins sont indemnes.

D'après ces résultats, on peut se rendre compte que l'influence *activante* des injections sous-cutanées d'huile d'olive stérilisée sur l'évolution de la tuberculose expérimentale du cobaye et du lapin est tout à fait nette. Elle s'exerce de la même façon lorsque les cobayes sont infectés, non avec une souche d'origine bovine, mais avec une souche d'origine humaine.

EXPÉRIENCE IV. — Le 18 décembre 1931, neuf cobayes reçoivent sous la peau de l'aîne droite 0 milligr. 0001 de la souche humaine G. Cinq sont traités par des injections sous-cutanées bi-hebdomadaires d'huile d'olive stérilisée. Quatre sont conservés comme témoins. Deux traités et deux témoins sont morts en cours d'expérience. Tous les autres ont été sacrifiés le 2 février 1932.

Chez les cobayes traités, les ganglions inguinaux et sous-lombaires sont trois fois plus gros que ceux des témoins. Les rates des cobayes traités sont très hypertrophiées et couvertes de tubercules, alors que celles des cobayes témoins sont de volume normal et ne présentent que quelques rares tubercules. Chez les cobayes traités, on trouve une grosse masse de ganglions trachéo-bronchiques; l'un d'eux a des granulations sur les poumons; un autre sur le foie, alors que ces lésions n'existent pas chez les témoins. Dans les rates des cobayes traités, les bacilles de Koch sont deux fois plus nombreux que dans celles des témoins.

2° PAR VOIE PÉRITONÉALE.

EXPÉRIENCE V. — Neuf cobayes reçoivent le 5 novembre 1931 dans le péritoine 0 milligr. 0001 de la souche bovine Vallée. Six sont traités par des injections bi-hebdomadaires d'huile d'olive stérilisée, trois dans le péritoine, trois sous la peau. Trois sont conservés comme témoins.

Dans chaque lot, un animal meurt prématurément. Le 15 décembre, les six

cobayes survivants sont sacrifiés. Les deux traités par des injections intrapéritonéale d'huile ont de gros ganglions sous-lombaires ; l'épiploon forme une énorme masse boudinée ; la rate est hypertrophiée avec de nombreux

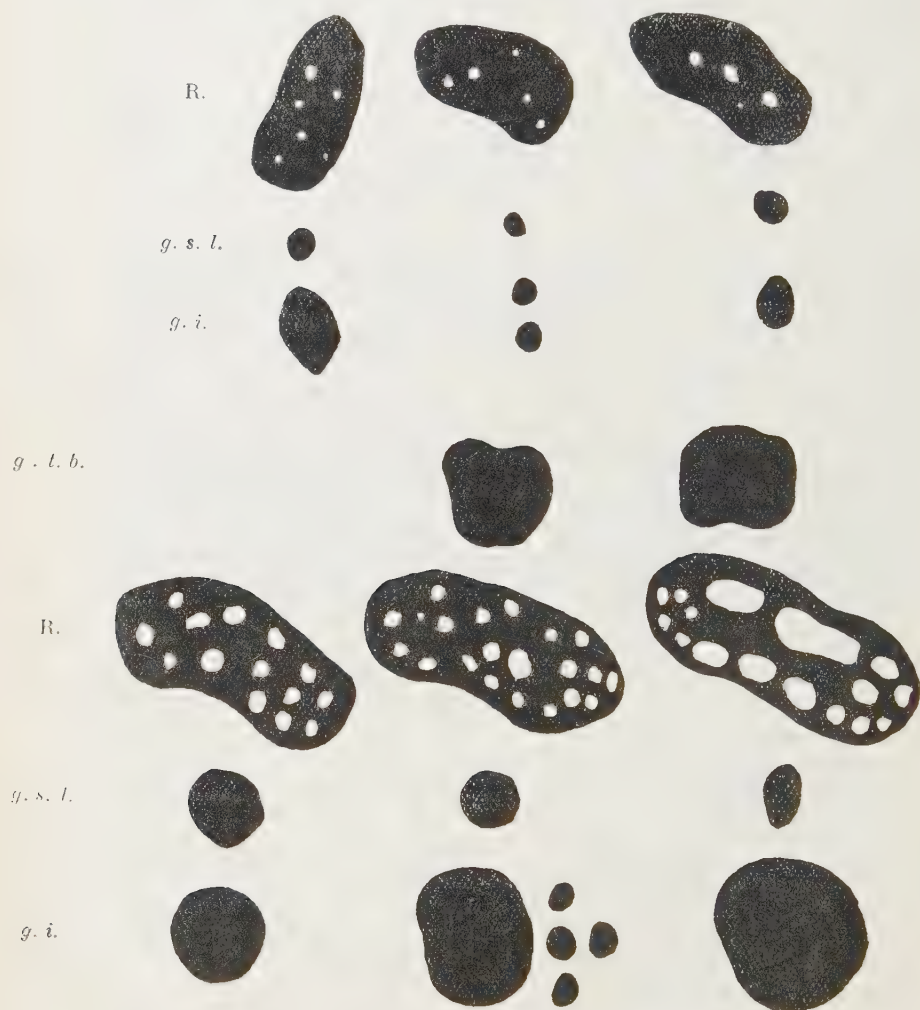


FIG. 2. — Cobayes de l'expérience IV inoculés sous la peau avec 0 mgr. 0001 de la souche humaine G et sacrifiés 46 jours après. En haut, témoins ; en bas, traités par des injections sous-cutanées d'huile d'olive stérilisée. R, rates ; *g. t. b.*, ganglions trachéo-bronchiques ; *g. s. l.*, ganglions sous-lombaires ; *g. i.*, ganglions inguinaux.

tubercules ; le foie présente des granulations ; les ganglions trachéo-bronchiques sont hypertrophiés et durs. Chez les deux cobayes traités par voie

cutanée, les lésions sont semblables. Chez les témoins, les ganglions sont d'un volume moitié moindre que chez les traités. Les lésions de la rate sont moins nombreuses. Le foie est indemne. Les ganglions trachéo-bronchiques sont à peine hypertrophiés.

En traitant par la voie péritonéale des cobayes infectés par la même voie, on obtient une aggravation marquée de tous les symptômes, de même par injections sous-cutanées d'huile à des cobayes infectés de la même façon.

3° PAR VOIE DIGESTIVE.

Après avoir constaté l'influence activante sur la tuberculose du cobaye et du lapin de l'huile d'olive introduite par voie sous-cutanée ou péritonéale, nous avons voulu nous rendre compte si elle agissait de la même façon par voie digestive.

EXPÉRIENCE VI. — Dix cobayes sont inoculés sous la peau de l'aîne droite le 2 octobre 1930 avec 0 milligr. 0001 de la souche bovine Vallée. Six d'entre eux reçoivent chaque jour par ingestion 1 cent. cube d'huile d'olive; les quatre autres sont conservés comme témoins.

Deux cobayes traités et deux cobayes témoins meurent en cours d'expérience. Les autres sont sacrifiés le 17 novembre.

Chez les cobayes qui ont reçu l'huile d'olive par la voie digestive, les ganglions inguinaux et sous-lombaires sont plus gros que chez les témoins, mais entre les traités et les témoins la différence de volume de ces groupes ganglionnaires n'est pas aussi marquée qu'après injection sous-cutanée du même produit. Deux sur quatre des cobayes ayant ingéré régulièrement de l'huile d'olives ont des lésions de la rate plus prononcées que chez les témoins, ainsi que des ganglions trachéo-bronchiques plus hypertrophiés.

Dans une autre expérience effectuée sur dix cobayes, les résultats ont été les mêmes.

EXPÉRIENCE VII. — Six lapins sont inoculés le 16 décembre 1931 par voie veineuse avec 1/5000 milligr. de la souche bovine Vallée. Quatre d'entre eux ingèrent chaque jour 1 cent. cube d'huile d'olive; deux sont gardés comme témoins.

Deux lapins traités meurent prématurément. Les deux autres, ainsi que deux témoins, sont sacrifiés le 4 février 1932. Les deux lapins traités ont des lésions pulmonaires plus nombreuses que les deux lapins témoins.

Il ressort de ces expériences que l'influence activante de l'huile d'olive sur la tuberculose du cobaye et du lapin est moins prononcée lorsqu'elle est introduite par voie digestive. Si les lésions des animaux traités sont en général plus accusées que celles des témoins, il n'existe pas entre elles la dispro-

portion que nous avons constatée dans les expériences de traitement par voie sous-cutanée.

Comme, dans le traitement par ingestion, nous avons em-



FIG. 3. — Cobayes de l'expérience VIII inoculés sous la peau avec 0 mgr 0001 de la souche bovine Vallée et sacrifiés 49 jours après. En haut, témoins ; en bas, traités par des injections sous-cutanées d'huile d'olive stérilisée.

ployé de l'huile d'olive naturelle, alors que pour les injections sous-cutanées elle était stérilisée, on pouvait se demander si un facteur autre que celui de la voie d'introduction n'entraînait

pas en jeu. Les vitamines D exerceraient-elles sur la tuberculose une action favorable qui masquerait en partie l'influence nocive des matières grasses ?

Pour le vérifier nous avons entrepris l'expérience suivante :

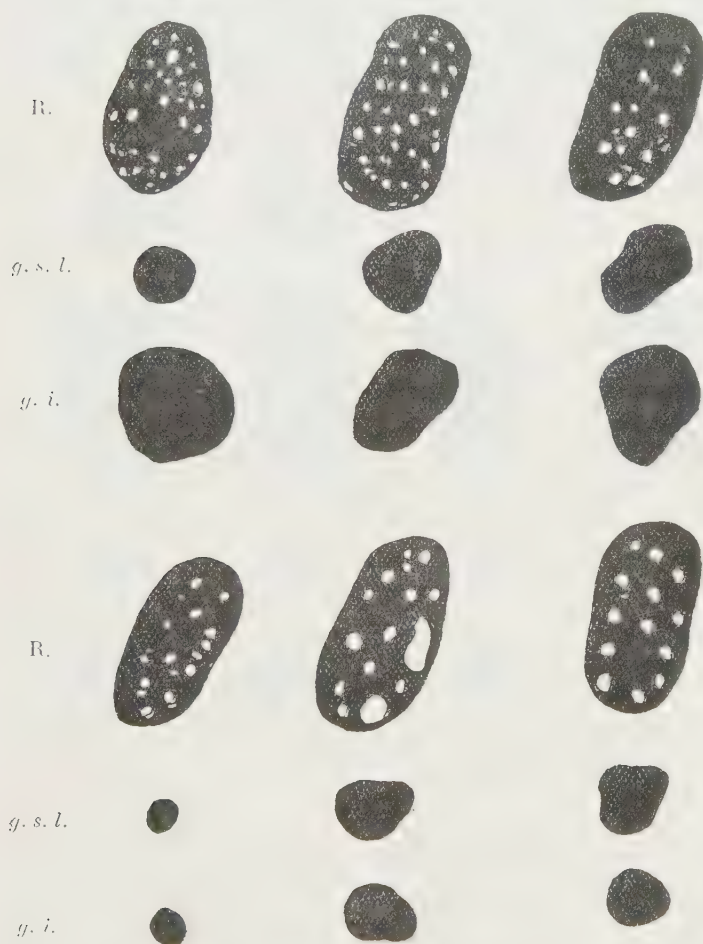


FIG. 4. — Cobayes de l'expérience VIII inoculés sous la peau avec 0 mgr. 0001 de la souche bovine Vallée et sacrifiés 49 jours après. En haut, traités par des injections sous-cutanées d'huile d'olive naturelle ; en bas, traités par ingestion d'huile d'olive stérilisée.

EXPÉRIENCE VIII. — Le 8 octobre 1931, trente cobayes reçoivent sous la peau de l'aîne droite 0 milligr. 0001 de la souche bovine Vallée.

Six sont traités deux fois par semaine par injection sous-cutanée de 1 cent,

cube d'huile d'olive stérilisée et six autres par injection sous-cutanée de 1 cent. cube d'huile d'olive naturelle.

Six ingèrent chaque jour 1 cent. cube d'huile d'olive stérilisée et six autres 1 cent. cube d'huile d'olive naturelle. Six sont gardés comme témoins.

Tous ces animaux sont sacrifiés le 26 novembre. Aussi bien dans le lot soumis aux injections sous-cutanées que dans celui soumis à l'ingestion d'huiles d'olive, les cobayes traités par l'huile stérilisée et ceux traités par l'huile naturelle se sont comportés de la même façon.

Dans le premier lot (injections sous-cutanées), les ganglions inguinaux et sous-lombaires des cobayes traités atteignent un volume double ou triple de celui des ganglions correspondants des témoins.

Certains des ganglions les plus gros renferment d'énormes poches caséuses.



FIG. 5. — Cobayes de l'expérience VIII inoculés sous la peau avec 0 mgr. 0001 de la souche bovine Vallée et sacrifiés 49 jours après. Traités par ingestion d'huile d'olives naturelle.

Au point d'inoculation du bacille, qui est aussi le lieu d'injection de l'huile, on trouve des abcès caséux plus volumineux que chez les témoins et renfermant plus de bacilles de Koch que chez ces derniers. Les rates des cobayes traités présentent en général des lésions plus importantes que celles des témoins. Enfin, certains des animaux soumis aux injections d'huile ont des lésions des poumons ou du foie avec grosse hypertrophie des ganglions trachéo-bronchiques, alors que chez les témoins ces organes sont indemnes.

Dans le second lot (ingestion d'huile d'olive stérilisée ou naturelle), les lésions ganglionnaires locales sont plus prononcées que celles des témoins, mais ne sont pas aussi marquées que chez les cobayes traités par injection sous-cutanée. Les lésions de la rate sont à peu près semblables à celles observées chez les cobayes témoins; mais, tandis que chez ces derniers les autres organes sont indemnes, on trouve chez certains traités des lésions du foie et une grosse hypertrophie des ganglions trachéo-bronchiques.

Nous n'avons donc observé aucune différence entre les effets de l'huile d'olive stérilisée et de l'huile naturelle. *Qu'elle soit privée ou pourvue de ses vitamines, l'huile d'olive exerce une influence activante sur l'évolution du processus tuberculeux, mais par la voie digestive cette action est moins marquée que par la voie sous-cutanée.*

Action de l'huile de foie de morue.

EXPÉRIENCE IX. — Dix cobayes sont inoculés le 5 février 1932 sous la peau de l'aîne droite avec 0 milligr. 0001 de la souche bovine Vallée.

Cinq cobayes ingèrent chaque jour 1 cent. cube d'huile de foie de morue. Cinq sont gardés comme témoins.

Deux cobayes traités et deux témoins meurent en cours d'expérience. Les six autres sont sacrifiés le 11 mars 1932.

Chez les cobayes traités, les ganglions inguinaux ou sous-lombaires sont en général plus volumineux que chez les témoins; chez deux d'entre eux sur trois, les rates sont plus hypertrophiées, présentant plus de lésions que celles des témoins. Chez tous les traités, les lésions des ganglions trachéo-bronchiques sont beaucoup plus prononcées que chez les témoins. Les bacilles de Koch sont plus nombreux dans les lésions des animaux traités que dans celles des témoins.

EXPÉRIENCE X. — Six lapins sont inoculés dans la veine le 18 mars 1932 avec 0 milligr. 001 de la souche bovine Vallée. Quatre sont traités par ingestion quotidienne de 1 cent. cube d'huile de foie de morue. Deux sont conservés comme témoins.

Tous sont sacrifiés à la fin d'avril. Les lapins témoins ont 8 à 10 tubercules sur chaque poumon. L'un d'eux présente une granulation sur un rein. Les lapins traités ont des lésions pulmonaires plus prononcées. Leurs rates sont hypertrophiées. Chacun de leurs reins présente 2 ou 3 granulations.

Comment expliquer l'action favorisante que des matières grasses, telles que l'huile d'olive et l'huile de foie de morue, exercent sur la tuberculose du cobaye et du lapin?

Nous avons constaté chez tous les animaux traités, aussi bien par voie sous-cutanée que par voie digestive, une multiplication des bacilles de Koch beaucoup plus intense que chez les témoins.

Edmond R. Long et Arthur J. Worwald, ayant observé que la glycérine, administrée à des rats tuberculeux par ingestion ou par injection sous-cutanée, favorise la multiplication des bacilles tuberculeux dans les lésions et l'extension de ces der

nières, ont essayé d'obtenir un effet opposé. Pour réduire la



Fig. 6. — Cobayes de l'expérience IX inoculés sous la peau avec 0 mgr. 0001 de la souche bovine Vallée et sacrifiés 35 jours après. En haut, témoins ; en bas, traités par ingestion d'huile de foie de morue.

proportion de glycérine libre contenue dans les tissus, ils ont

introduit dans l'organisme de rats tuberculeux de grandes quantités d'acide palmitique, pensant qu'un excès de cet acide gras se combinerait dans le corps à la glycérine des tissus pour former une graisse neutre ne favorisant pas la croissance du bacille tuberculeux. Si les lésions des animaux ainsi traités leur ont paru moins importantes, ils ont été frappés par le fait que les bacilles acido-résistants étaient chez eux beaucoup plus nombreux. Ces constatations et les nôtres prouvent que les graisses neutres favorisent *in vivo* la multiplication du bacille tuberculeux.

A. Sedych et J. Seliber ont établi que ce germe consomme énergiquement les graisses en détruisant à la fois leurs deux constituants, la glycérine et l'acide gras. Ces auteurs ont pu, comme l'avait fait Fontès, obtenir le développement du bacille de Koch sur gélose ordinaire contenant X à XII gouttes par tube d'huile d'olive ou d'huile de foie de morue incorporée dans la gélose liquéfiée au préalable et dans un milieu minéral additionné soit de graisse de bœuf fondue, soit de cire d'abeilles.

Nous avons nous-même reproduit cette expérience. Nous avons constaté qu'il suffit d'ajouter à de la gélose ordinaire de l'huile d'olive, de l'huile de foie de morue, ou des substances ciro-graisseuses du bacille tuberculeux, pour que ce milieu, impropre au développement de ce germe, permette d'en obtenir la culture.

Alors que l'ensemencement d'un bacille tuberculeux de type humain ou de type bovin sur gélose ordinaire ne donne lieu à aucun développement de ces germes, on observe sur gélose additionnée d'huile d'olive, ou d'huile de foie de morue, ou de substances ciro-graisseuses bacillaires, l'apparition de colonies constituées par des bacilles tuberculeux à aspect granuleux, aussi bien pour le bacille humain que pour le bacille bovin. Avec l'huile de foie de morue et les substances ciro-graisseuses du bacille de Koch, les colonies développées sont plus rares qu'avec l'huile d'olives.

Il semble donc que les matières nutritives apportées au bacille tuberculeux par ces substances suffisent à assurer son développement.

Conclusions.

Il ressort de ces expériences que chez les cobayes inoculés par la voie sous-cutanée avec un bacille tuberculeux d'origine humaine ou bovine, et traités par des injections bi-hebdomadaires sous la peau de 1 cent. cube d'huile d'olive, les lésions sont plus prononcées que chez les témoins. Les ganglions inguinaux et sous-lombaires sont beaucoup plus volumineux. Les lésions spléniques sont en général plus nombreuses et plus étendues; d'autre part, certains animaux traités présentent des lésions du foie, des poumons et des ganglions trachéo-bronchiques, alors que chez les témoins ces organes sont indemnes.

Chez les cobayes traités par ingestion quotidienne d'huile d'olive ou d'huile de foie de morue, les lésions ganglionnaires locales sont à peine plus prononcées que chez les témoins, mais les lésions spléniques sont en général plus nombreuses, et les ganglions trachéo-bronchiques et le foie sont plus précocement atteints.

De même chez les lapins inoculés par voie veineuse et traités par injection sous-cutanée ou par ingestion d'huile d'olive ou d'huile de foie de morue, les lésions pulmonaires des animaux traités sont pour la plupart plus nombreuses que chez les témoins.

Aucune différence n'a été constatée entre les effets de l'huile stérilisée et de l'huile naturelle.

Cette activation des lésions paraît provenir de la multiplication des bacilles de Koch, qui sont beaucoup plus nombreux dans les organes des animaux traités que dans ceux des témoins.

BIBLIOGRAPHIE

- A. BOQUET et L. NÈGRE, Action des divers constituants du bacille de Koch sur l'évolution de la tuberculose expérimentale du lapin et du cobaye. *C. R. Acad. Sciences*, 3 mars 1925.
L. JULLIEN, Note sur les injections d'huile cholestérinée dans la tuberculose expérimentale du cobaye. *C. R. Soc. Biol.*, 93, p. 1311.

- EDMOND R. LONG et ARTHUR J. VORWALD, An attempt to influence the growth of the tubercule bacillus in the animal body by modifying the concentration of a growth producing substance (glycerol) in the tissues. *Amer. Rev. of. Tub.*, **32**, 1930, p. 636.
- A. SEDYCH et J. SELIBER, Sur la décomposition des graisses par le bacille tuberculeux. *C. R. Soc. Biol.*, **97**, 11 juin 1928.
- V. C. TROTEAU, Action de l'huile de foie de morue sur l'évolution de la tuberculose expérimentale provoquée chez le lapin par le bacille d'origine bovine. *C. R. Soc. Biol.*, **102**, p. 143.

RECHERCHES SUR LA VACCINATION PRÉVENTIVE DES CHIENS

AVEC LE VIRUS RABIQUE FIXE-CHIEN

par DEMETRE JONNESCO (Docent Universitaire).

On a prétendu que la virulence du virus rabique de rue n'arrive pas à se fixer chez le chien et qu'elle finit par se perdre après un certain nombre de passages par le cerveau de cet animal. Magendie autrefois, puis Celli et Marino Zuppi, ayant inoculé au chien, sous la dure-mère ou dans la chambre antérieure, du virus de rue, ont constaté, après des passages de chien à chien, que vers le dixième passage les animaux cessaient de présenter la forme furieuse et succombaient à la rage paralytique. Mais, en poursuivant les passages en série, ils ont observé que les chiens succombaient par cachexie au bout d'un temps assez long et que leur cerveau ne provoquait plus la rage chez le lapin. Les expériences faites plus tard par Blasi et par Russo-Travali avaient pour but de prouver que si le virus rabique de rue conserve dans la nature sa virulence, c'est parce qu'il a passé par le cerveau du chat, ce qui est en contradiction avec les conclusions de Pasteur, selon lesquelles la virulence de la rage canine s'est « fixée elle-même par les nombreux passages de chien à chien, par morsures, depuis un temps immémorial ».

A. Marie, en 1907, ayant repris les expériences de Celli et de Marino-Zuppi, est arrivé à des conclusions très intéressantes. En faisant passer le virus de rue par le cerveau du chien (douze passages dans un cas, et quinze dans un autre), Marie conclut que, loin de s'affaiblir, le virus semblait au contraire fixer sa virulence, de même que ce virus fixe sa virulence par plusieurs passages par l'encéphale d'un rongeur, — lapin ou cobaye.

V. Babès est arrivé lui aussi aux mêmes résultats.

En dehors des recherches de Celli et de M. Zuppi — qui sont

en contradiction avec les intéressantes conclusions, mentionnées ci-dessus, de A. Marie et de V. Babès, — je ne connais pas, après les investigations que j'ai pu faire, d'expériences qui puissent contribuer à mettre cette question au clair.

Le présent mémoire se propose de relater des expériences personnelles, commencées au mois de mars 1929.

Pour obtenir le virus fixe-chien, j'ai choisi le virus rabique de rue d'un loup que j'avais à ma disposition et qui, tué par des paysans, présentait à l'examen histologique du cerveau de nombreux corps de Negri.

V... (A.), trente-cinq ans, agriculteur, habitant du département de Dâmbovitza, se présente au traitement antirabique le 26 mars 1929, ayant été mordu la veille par un loup enragé dont il nous apportait la tête. Le patient présentait une plaie à la face antérieure des deux avant-bras déchirés par des morsures très profondes. L'examen microscopique nous montrait, dans la région de la corne d'Ammon de ce loup, de nombreux corps de Negri et d'assez fréquents corpuscules dans d'autres régions. La fixation des pièces fut faite dans l'acétone. En dehors des corpuscules d'une structure très fine, nous en avons trouvé en forme de mûre, des corps de Negri à inclusions basophiles et une hyperémie accentuée à nombreux foyers d'infiltration leucocytaire. Les parois vasculaires présentaient par endroits un gonflement de l'endothélium; en d'autres endroits, les capillaires étaient obstrués par des leucocytes polynucléaires ou mononucléaires, par des masses hyalines ou fibrineuses. A côté de ces lésions, les cellules nerveuses présentaient des lésions dégénératives, avec disparition des zones périnucléaires, ou bien des noyaux devenus plus vésiculeux, avec un nucléole hypertrophié. Parfois, le noyau, entouré de vacuoles ou de corpuscules, était complètement déformé; souvent il se trouvait comprimé ou séquestré dans un espace très réduit, et alors, à la place du noyau, il n'y avait qu'une zone légèrement assombrie. Dans les cellules nerveuses et dans le reste, on constatait l'hypertrophie des neuro-fibrilles, qui, pour la première fois, a été constatée dans la rage par le professeur G. Marinesco.

Le virus rabique du loup examiné par nous dans ce cas fut alors inoculé par passages successifs à des lapins et à des chiens.

La virulence du virus rabique-loup a été également éprouvée sur des souris blanches et sur des cobayes. 5 cobayes qui, inoculés par voie intracérébrale avec ce virus, ont succombé après une incubation de onze à dix-neuf jours, présentaient de nombreux corps de Negri et des lésions de rage. 10 souris, inoculées par voie sous-cutanée avec 0,5 cent. cube de virus rabique-loup dilué 1/50, ont succombé après une incubation de quinze à vingt-trois jours.

Inoculation du virus rabique-loup aux lapins.

PASSAGE	JOURS	CORPS DE NEGRI
Premier	19	+
Deuxième	13	+
Troisième	13	+
Quatrième	12	+
Cinquième	9	+
Sixième	12	+
Septième	10	+
Huitième	22	+
Neuvième	17	+
Dixième	8	+
Onzième	12	+
Douzième	9	+
Treizième	11	+
Quatorzième	10	+
Quinzième	10	+ —
Seizième	10	—
Dix-septième	11	—
Dix-huitième	10	—
Dix-neuvième	11	—
Vingtième	15	—
Vingt et unième	10	—
Vingt-deuxième	9	—
Vingt-troisième	9	—
Vingt-quatrième	9	—
Vingt-cinquième	9	—

Jusqu'au quatorzième passage, les corpuscules de Negri étaient donc devenus de plus en plus rares, et l'incubation s'est réduite, au vingt-deuxième passage, à neuf jours.

Inoculation du virus rabique-loup aux chiens.
Obtention du virus fixe-chien.

PASSAGE	JOURS	CORPS DE NEGRI
Premier	38	++++
Deuxième	18	++++
Troisième	8	++ — (C. N. pâles).
Quatrième	10	+ — (C. N. pâles et rares).
Cinquième	10	+ — (C. N. pâles et rares).
Sixième	9	+
Septième	9	+
Huitième	11	+
Neuvième	13	+
Dixième	11	+
Onzième	12	+
Douzième	11	+
Treizième	10	— (C. N. extrêmement rares et très pâles).
Quatorzième	10	— (C. N. absents).

Au premier passage sur le chien, l'incubation était de trente-huit jours; au troisième passage, elle diminua subitement à huit jours, et monta de nouveau à dix, onze ou treize jours, en se fixant au treizième passage à dix jours.

Le virus restait ainsi fixé à dix jours jusqu'au cinquante-deuxième passage (5 mars 1931); dès ce passage, nous avons observé que le chien trépané semblait résister à l'infection. Cela nous a suggéré deux hypothèses : ou bien l'animal jouissait d'une immunité acquise ou d'une résistance naturelle, ou bien le virus une fois passé par le chien avait perdu sa virulence. Nos recherches ultérieures nous ont cependant montré que le virus n'avait pas du tout perdu sa virulence sur le chien (un autre chien trépané par nous devint rabique le dixième jour) et que dans notre cas nous avons eu affaire à un animal qui possédait une résistance naturelle contre l'infection rabique. Pour plus de sûreté, nous avons inoculé par trépanation (en mars 1931) le même virus — conservé en glycérine — à 2 lapins, qui sont tombés paralysés tous les deux le neuvième jour après la trépanation.

De l'émulsion cérébrale de ces lapins, nous avons ensuite inoculé par trépanation à des chiens 0,3 cent. cube pour chacun. A notre surprise, le virus se montra non seulement virulent, mais d'une virulence accrue, l'incubation étant réduite au cinquante-troisième passage de dix à neuf jours, et au cinquante-quatrième passage à huit jours seulement. *Entre le cinquante-sixième passage (10 mai 1931) et le quatre-vingt-cinquième passage (27 février 1932), l'incubation s'est fixée à sept jours, les chiens trépanés présentant constamment des phénomènes paralytiques qui duraient un à deux jours.*

Pour exclure l'éventualité de la résistance naturelle à l'infection — bien que cette résistance soit assez rare (4 cas sur quatre-vingt-cinq passages) — les instituts antirabiques, au moins ceux des grandes villes, devraient élever des chiens destinés spécialement à l'entretien du virus de passage.

Or, nous pouvons, pour plus de sûreté, conserver en glycérine le virus de passage, en surveillant en même temps l'apparition de la paralysie chez le chien trépané. Il est très intéressant de remarquer que, chez quelques-uns des chiens les plus âgés, l'incubation est d'un demi-jour ou même d'un jour plus longue que l'incubation normale (sept jours), tandis que l'in-

cubation des chiens plus jeunes est d'un jour plus courte.

Tous les chiens de passage présentaient les lésions histopathologiques de la rage. Jusqu'au troisième passage, les corpuscules sont très abondants dans la région de la corne d'Ammon et ils deviennent de plus en plus rares jusqu'au dixième passage. A partir du onzième passage, les corpuscules de Negri deviennent très pâles et très rares et, dès le douzième passage, on n'en trouve plus du tout.

Il est à remarquer aussi que les chiens des douzième, treizième et quatorzième passages ne présentent pas de corps de Negri dans la corne d'Ammon, mais leurs glandes salivaires inoculées par trépanation à d'autres chiens ont produit des corpuscules nettement oxyphiles typiques.

Inoculée à d'autres chiens, l'émulsion des glandes salivaires sous-maxillaires du chien du quinzième passage ne produit que des corpuscules décolorés et très peu oxyphiles qui disparaissent complètement dès le seizième passage.

L'adaptation du virus rabique de rue-loup pour le chien produit non seulement la disparition des corpuscules, mais aussi la fixation des phénomènes cliniques.

Dès le douzième passage, pas un seul des chiens inoculés par trépanation avec le virus ainsi obtenu n'a présenté de salivation, ni d'excitation. Les phénomènes paralytiques commencent dès le douzième passage par la parésie des membres, et ils sont suivis de quadriplégie et de contractures générales. Le chien ainsi paralysé succombe après un ou deux jours, après avoir présenté de l'incontinence d'urine.

VACCINATION PRÉVENTIVE DES CHIENS, AVEC LE VIRUS RABIQUE FIXE-CHIEN.

Le cerveau enlevé aseptiquement après l'ouverture de la boîte crânienne peut être immédiatement utilisé pour la préparation du vaccin.

Pour éviter les infections *post mortem*, il est recommandé de sacrifier les chiens ou encore mieux de laisser leur cerveau un à deux jours en glycérine stérilisée. Du reste, nous savons qu'on peut laisser le cerveau en glycérine pendant vingt, ou

même vingt-cinq jours, sans inconvénients pour la virulence du virus rabique.

PRÉPARATION DU VACCIN. — On émulsionne dans un verre conique 30 grammes de cerveau complet (encéphale, bulbe, cervelet), en y ajoutant 2.000 cent. cubes d'eau physiologique stérilisée, 8,5 p. 1.000. Puis on filtre soigneusement sur gaze stérilisée et on ajoute 20 cent. cubes d'acide phénique, c'est-à-dire une proportion de 1 cent. cube pour 100 cent. cubes d'émulsion. On met ensuite ce mélange dans un ballon; on l'agite et on le porte à l'étuve à 37° pendant trois jours; après ce délai, le mélange est utilisable.

INNOUITÉ DU VACCIN. — Avec ce mélange, nous avons fait une série d'essais afin de préciser la dose qui peut être inoculée sans risques. Après la préparation du vaccin, nous avons trépané des chiens et des lapins et nous leur avons fait trois séries d'*inoculations intracérébrales*, en prenant : pour la première inoculation, le mélange qui était resté exposé *un seul jour* à la température de 37°; pour la deuxième inoculation et pour la troisième, le mélange qui avait été exposé à la même température, deux et trois jours respectivement. Dans le premier cas, les inoculations produisirent la rage chez les chiens après une incubation prolongée d'un jour. Les chiens tombaient paralysés après onze jours et les lapins après treize jours. (A ce moment l'incubation du virus était de dix jours.)

Dans le deuxième cas (deux jours à 37°), les chiens tombaient paralysés le treizième jour et les lapins le quinzième jour. Dans le troisième cas (trois jours à 37°), les chiens tombaient paralysés le seizième jour, tandis que les lapins restaient indemnes. Après un quatrième jour d'exposition à 37°, le vaccin est resté absolument inoffensif.

Les inoculations sous-cutanées chez les chiens, pratiquées avec une grande quantité de vaccin (150 à 200 cent. cubes) en une seule fois, laissent les animaux indemnes plus de quatre mois.

IMMUNISATION PRÉVENTIVE DES CHIENS.

Dans nos premières expériences faites sur 30 chiens, nous avons inoculé journellement, par voie sous-cutanée, le vaccin exposé trois jours à 37°; la première injection était de 5 cent. cubes; la deuxième, de 15 cent. cubes, les troisième, quatrième et cinquième de 20 cent. cubes.

A titre de comparaison, nous avons vacciné 2 chiens avec du vaccin virus fixe-lapin, pendant neuf jours consécutifs. Quinze jours après la dernière inoculation, nous avons séparé en deux groupes les chiens vaccinés avec du virus fixe-chien, avec l'émulsion 1/100 de virus de rue-chien, contenant de nombreux corps de Negri, 15 chiens furent inoculés dans le nerf sciatique et 15 directement dans le globe oculaire. Tous sont restés en bonne santé plus de quatre mois; ils furent ensuite sacrifiés sauf deux des plus beaux, qui ont été donnés à une personne chez laquelle ils se trouvent encore en pleine santé. Les 2 chiens vaccinés avec le virus fixe-lapin et inoculés eux aussi, l'un dans le nerf sciatique, l'autre dans le globe oculaire, avec la même quantité et avec le même virus de rue, succombèrent tous les deux après une incubation de vingt-trois jours pour le premier et de quatorze jours pour le second. A titre de contrôle, nous nous sommes servis de deux chiens non vaccinés; ils ont succombé à la rage après une incubation de dix-neuf jours pour le chien injecté dans le nerf sciatique et une incubation de treize jours pour le chien trépané.

Dans le courant de l'année 1931, nous avons fait des recherches sur l'effet immunisant du virus rabique fixe-chien, en comparaison avec l'effet immunisant du virus fixe-lapin et du virus de rue formolé.

Nous avons fait immuniser sept chiens avec le virus rabique fixe-chien, par la méthode décrite dans ce mémoire (5 chiens avec du virus fixe-lapin fourni par l'Institut D^r V. Babès; en total 80 cent. cubes par doses : n^{os} 6, 5, 4, 3, 2, 1 et 0 et 5 autres chiens avec du virus de rue provenant d'un chien à nombreux corps de Negri et préparé suivant la méthode de V. Puntoni). Quinze jours après la dernière injection, nous avons trépané

les animaux en leur inoculant pour chacun 0,3 cent. cube d'émulsion cérébrale de virus fixe-chien (1/100). Des 7 chiens immunisés avec du virus fixe-chien, 6 sont restés en vie cinq mois; un seul a été paralysé le vingtième jour après l'injection; quant à ceux immunisés avec le vaccin virus fixe-lapin, ils ont été tous frappés de paralysie après sept jours (incubation normale de notre virus fixe-chien).

4 chiens immunisés avec du virus de rue formolé ont été frappés de paralysie le septième, et respectivement les dixième, onzième et neuvième jours; un seul des cinq a résisté.

La valeur neutralisante du sérum provenant des chiens immunisés avec du virus fixe-chien a été étudiée en comparaison avec l'action rabicide du sérum de l'homme et du lapin, aussi bien au cours de l'immunisation qu'après celle-ci. L'action neutralisante du sérum antirabique provenant du chien ou du lapin, ainsi que celle du sérum de l'homme traité contre la rage, est inconstante mais variable, comme l'ont montré Remlinger et Bailly dans un travail publié dans le *Bulletin de l'Institut Pasteur* en 1931.

Dans l'un de nos cas, le mélange de 4 parties de sérum antirabique du lapin + 1 partie de virus fixe-lapin est neutralisé, tandis que le mélange à 1/2 n'est pas neutralisé. Dans un autre cas, le mélange de 1 partie virus fixe-chien + 150 parties de sérum antirabique du chien est neutralisé, tandis que le même sérum avec le même virus, dans un mélange de 1/120 seulement, n'est pas neutralisé.

En étudiant la valeur rabicide du sérum antirabique fourni par plusieurs séries de lapins, nous sommes arrivé aux conclusions suivantes :

Tandis que la valeur neutralisante du sérum des chiens immunisés avec le virus fixe-chien va jusqu'à 1/150, le sérum des chiens immunisés avec le virus de rue formolé atteint une valeur neutralisante maximum de 1/100. Le sérum des lapins immunisés avec le virus fixe-lapin atteint une valeur neutralisante maximum de 1/10.

Malgré leur sérum neutralisant à 1/10, les lapins ainsi immunisés ne résistent pas à l'inoculation rabique sous la dure-mère, tandis que la plupart des chiens immunisés avec du vaccin virus fixe-chien y résistent.

Les chiens immunisés avec le virus de rue formolé résistent d'une manière inconstante à la trépanation (1/5).

Le sérum d'homme (20 cas étudiés) atteint — quinze jours après la fin du traitement — un pouvoir neutralisant maximum de 1/10, malgré le traitement intensif répété 7 fois dans 1 cas, 14 fois dans un autre cas, dans l'intervalle de deux ans (un infirmier de la Faculté vétérinaire).

La durée du pouvoir neutralisant — telle qu'elle résulterait de nos recherches — est à peu près de quatre mois chez l'homme et de douze mois chez les animaux (chiens et lapins). En même temps, nous avons eu l'occasion de nous convaincre qu'il n'existe pas de parallélisme absolu entre le pouvoir neutralisant du sérum d'un animal (quel que soit le virus rabique ou le procédé de vaccination) et la résistance de cet animal à l'infection rabique. Nous venons de citer le cas d'un chien (vacciné avec du virus de rue formolé ayant la valeur immunisante de 1/100), qui a été paralysé le dix-neuvième jour après la trépanation. Il faut aussi mentionner que, malgré l'immunisation préalable et le pouvoir neutralisant à 1/10 de leur sérum, les lapins succombent de manière constante à la rage au cours de l'inoculation par voie oculaire ou par trépanation.

On peut conclure que le chien se comporte d'une manière exceptionnelle quant à la production d'un sérum antirabique très actif et qu'il acquiert un degré de résistance très marqué à l'infection rabique.

DURÉE DE L'EFFICACITÉ DU VACCIN.

Avec un vaccin préparé le 20 février 1930, et conservé deux semaines à une température de 4°, nous avons fait vacciner 3 chiens suivant la méthode déjà indiquée; trente jours après la préparation du vaccin, nous avons fait vacciner encore 3 chiens. Quinze jours après la vaccination, ces 6 chiens ont tous été inoculés par voie intraoculaire avec du virus rabique de rue-chien. Ils sont restés en parfaite santé jusqu'au 20 août 1930, date à laquelle ils ont été sacrifiés.

2 chiens qui nous servaient de contrôle, inoculés également par voie intraoculaire et avec la même source de virus rabique de rue, ont succombé après quinze et dix-sept jours respectivement.

3 chiens ont été vaccinés quarante jours après la préparation du vaccin; quinze jours après la vaccination, ils ont été inoculés par voie intraoculaire avec du virus rabique de rue, en même temps qu'un chien témoin. 2 chiens vaccinés ont résisté trois mois avant de succomber à la rage, un autre a vécu en pleine santé jusqu'au 1^{er} septembre 1930, où il fut sacrifié.

Le chien témoin succomba à la rage le dix-huitième jour après l'inoculation intraoculaire avec du virus de rue.

Toutes ces recherches montrent que notre vaccin conservé à 4° peut être employé avec de bons résultats, même un mois après sa préparation.

RÉINFECTION.

Des 30 chiens utilisés dans les premières expériences et qui avaient résisté quatre mois à la rage, nous en avons réinfecté de la même façon quatre en leur inoculant par voie intraoculaire du virus rabique de rue.

2 chiens témoins ont succombé le douzième et le quinzième jour respectivement, tandis que les chiens vaccinés et réinfectés sont restés en parfaite santé.

Les problèmes de la réinfection dans la rage sont loin d'être résolus; toutefois, les faits qui précèdent présentent une réelle importance au point de vue pratique.

CONCLUSIONS.

Notre virus rabique-loup, passé en séries par le chien, a fixé sa virulence pour le chien avec une incubation fixe de sept jours. Il compte actuellement quatre-vingt-cinq passages.

Le virus rabique fixe-chien nous permet d'immuniser très bien les chiens, étant donné que la voie d'infection adoptée pour l'épreuve de résistance a été la voie intraoculaire, une des plus sévères.

Il n'existe pas de parallélisme absolu entre la valeur neutralisante du sérum d'animaux immunisés et la résistance de ces animaux à l'infection rabique. La vaccination préventive des chiens, telle que nous venons de l'indiquer dans ce mémoire, présente plusieurs avantages :

Nous avons toujours à notre disposition le virus nécessaire pour la préparation d'un vaccin bien dosé;

Le virus rabique fixe-chien a pour les chiens une valeur immunisante supérieure à celle du virus fixe-lapin ou d'un virus de rue quelconque;

Atténué selon notre procédé et injecté par voie sous-cutanée — même en quantité très grande, — le virus rabique fixe-chien perd complètement sa virulence sur le chien;

Le vaccin conservé à 4° reste utilisable jusqu'à un mois après sa préparation;

Les chiens vaccinés résistent à la réinfection par voie intra-oculaire.

Nous espérons que, grâce à ces avantages d'une incontestable valeur pratique, notre méthode permettra de réaliser la vaccination antirabique préventive des chiens et des autres animaux domestiques, sans exposer les animaux aux risques possibles d'une infection vaccinale, ni leur entourage, au danger de la contamination par le chien vacciné.

Cette méthode très simple de vaccination antirabique des animaux n'utilise qu'un virus soigneusement contrôlé et tué, d'une innocuité certaine.

Institut D^r V. Babès,

Directeur : professeur D^r G. Proca, Bucarest.

BIBLIOGRAPHIE

- MARIE (Auguste). *L'Etude expérimentale de la rage*. Doin. Paris, 1909.
- MARIE (A.), REMLINGER (P.), VALLÉE (H.) : Rapports à la Conférence Internationale de la Rage, Paris, 1927.
- REMLINGER (P.) et BAILLY (J.) : Les confusions entre les virus neurotropes et le virus rabique. Moyens de les éviter. *Bull. de l'Institut Pasteur*, n° 1, janvier 1931.
- BABÈS (V.). *Traité de la Rage*, 1912.
- KRAUS, GERLACH, SCHWEINBURG : Lyssa bei Mensch und Tier, 1926.
- CELLI et ZUPPI (Marino) : Sulla trasmissione del virus rabbico da cane a cane. *Annali dell' Istituto d'Igiene sper. della R. Univ. di Roma*, 2, 1892, p. 1.
- BLASI (DE) et RUSSO TRAVALI : La rage expérimentale chez le chat. *Ces Annales*, 8, 1894, p. 338.

LA SPIROCHÉTOSE MÉNINGÉE EXPÉRIMENTALE,

par JEAN TROISIER.

Depuis une quinzaine d'années, il a été établi que le *Spirochæta ictero-hemorrhagiæ* (Inada et Ido) possédait en clinique humaine un tropisme méningé des plus fréquents (1). Dans l'ictère infectieux à rechute, type Mathieu-Weil, la réaction méningée, clinique, chimique et histologique, constitue un des éléments habituels du processus morbide.

Il a même été démontré que certaines méningites aiguës, cryptogénétiques en apparence, étaient liées à la pullulation du même spirochète dans les méninges sans qu'il y ait d'ictère, sans qu'il y ait d'hémorragie, et sans qu'il y ait atteinte des reins (S. Costa et J. Troisier).

Certaines de ces *spirochétoses méningées* s'accompagnent cependant d'un léger subictère. Elles font ainsi naturellement la transition entre la forme régulière hépato-néphrétique de la maladie et la forme purement méningitique.

Ces notions, qui ont reçu aujourd'hui la confirmation du temps (2), s'appuient sur une série de données expérimentales qui viennent en étayer la description. Le séro-diagnostic (Martin et Pettit) en série, la recherche des immunisines, l'isolement du virus en partant du liquide céphalo-rachidien, du sang et des urines ne laissent plus de doute sur l'autonomie de ces méningites aiguës spirochétiques de l'homme.

* *

Dans des recherches déjà lointaines, S. Costa et J. Troisier ont précisé que le virus spirochétique pouvait être bien plus actif en partant du cerveau des cobayes inoculés avec le *Spi-*

(1) Voy. Jean TROISIER, La spirochétose méningée. Son origine hydrique. *1er Congrès intern. de Bactériol.*, 2, juillet 1930.

(2) P. NICAUD, La spirochétose méningée pure. *La Presse Médicale*, 18 mai 1932, p. 793-796.

rochæta ictero-hemorragica, qu'en partant des autres viscères ou des urines. Cette action neurotrope du virus pouvait se déduire du raccourcissement de la période d'incubation anté-ictérique et de la durée globale de la maladie. Elle venait s'ajouter à cette donnée clinique parfois observée : la virulence du liquide céphalo-rachidien, à l'exclusion du sang et des urines (1).

* *

Nous avons repris récemment l'étude expérimentale de la spirochétose méningée sous un autre angle, celui de l'inoculation directe du virus au contact des centres nerveux ou des méninges des animaux.

Nos recherches ont porté sur le cobaye, l'animal de choix pour le spirochète d'Inada-Ido, le lapin, le chien et le singe (2).

Nous sommes partis d'une culture de spirochète ictéro-hémorragique (souche « Verdun ») du laboratoire de M. le professeur Pettit, qui sert depuis de longues années à M^{lle} Erber pour pratiquer les séro-diagnostic. Nous n'avons pas voulu nous servir des souches que nous avons isolées récemment des méningites aiguës humaines que nous avons observées à Paris. En employant une souche courante de spirochètes, nous ne pouvions être accusé d'employer une souche artificiellement douée d'un pouvoir méningotrope. Les résultats expérimentaux que nous avons obtenus tendent à prouver que la souche du laboratoire de M. Pettit possède sur l'animal le même tropisme méningé que d'autres souches isolées dans des méningites humaines anictériques.

* *

Sur le cobaye, il est très facile d'obtenir une méningite aiguë après inoculation sous-dure-mérienne de 2 à 3/10 de centimètre cube d'une culture moyennement virulente.

L'animal ne présente les premiers jours qui suivent l'inocu-

(1) S. COSTA et J. TROISIER, Virulence des centres nerveux dans la spirochétose ictéro-hémorragique expérimentale du cobaye. *C. R. Soc. de Biol.*, 17 février 1917.

(2) Une série d'expériences sur le jeune chat est restée sans résultats notables.

lation aucun phénomène morbide inhabituel, comme après l'injection parentérale courante. Vers le sixième jour, il s'arrête de manger, maigrit intensivement, reste sans bouger dans sa cage et meurt ictérique ou non vers le huitième jour, parfois un peu plus tard.

L'autopsie révèle, comme dans la spirochètose habituelle des

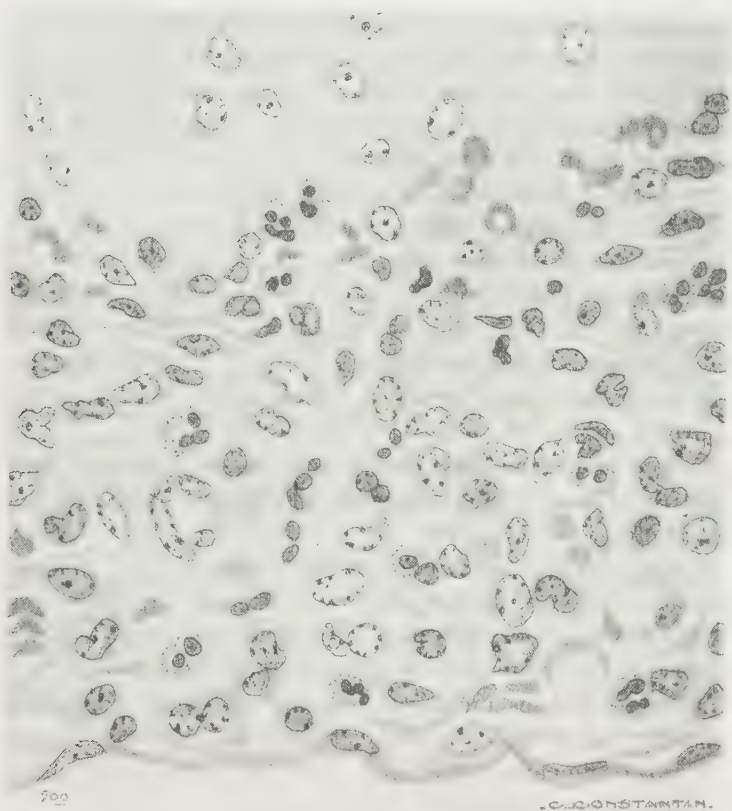


Fig. 1. — Méningite aiguë du cobaye. Réaction cellulaire panachée : grandes cellules mononucléées à noyau clair, mononucléaires de taille moyenne, polynucléaires neutrophiles, globules rouges.

hémorragies parenchymateuses, parfois même une légère suffusion hémorragique méningée, à distance ou non de l'inoculation. L'ictère manque chez les trois quarts de nos animaux, la souche employée ayant présenté, semble-t-il à cette période,

une atténuation de son aptitude ictérogène, sinon de sa virulence.

Ce n'est que l'examen histologique de l'encéphale qui permet sur le cobaye de préciser le processus méningitique.

Sur les coupes, même à faible grossissement, on remarque une augmentation marquée de l'épaisseur des méninges.

Au fort grossissement, on note un infiltrat cellulaire intense des espaces sous-arachnoïdiens. Fait fondamental : cette leucocytose est *panachée* : cellules mononucléées, du type lymphocytaire et surtout du type moyen et grand mononucléaire, leucocytes polynucléés surtout neutrophiles, à noyaux bien lobés et intacts, et enfin, souvent presque totalement absents, des globules rouges. Cette réaction méningée panachée, de mononucléaires et de polynucléaires, est naturellement sujette à variations suivant les cobayes examinés; par exception on en trouve à majoration lymphocytaire ou à prédominance neutrophile.

Cette méningite est presque toujours une méningite totale de la convexité. On peut lui trouver associées des lésions méningées des cornes ventriculaires, qui montrent bien la diffusion du processus.

Parfois de petites hémorragies méningées parsèment çà et là l'infiltrat leucocytaire et rappellent l'aptitude hémorragique du spirochète.

Le long des vaisseaux, on note très nettement une majoration du processus, tant au niveau des vaisseaux superficiels qu'au niveau des vaisseaux qui pénètrent dans la corticalité. Le tissu cérébral ne présente pas de signes nets d'encéphalite.

Ajoutons que les mêmes lésions de méningite aiguë peuvent s'observer en remplaçant l'injection de culture par l'injection de 2 à 3/10 de centimètre cube d'une émulsion lactescente d'un cerveau de cobaye mort de spirochétose.

La répartition des spirochètes étudiés sur coupes nitratées est sujette à grandes variations. Dans les cas typiques, on trouve une multitude de leptospires typiques, longs de 7 à 10 μ , minces, à extrémités en crochets, à spire à peine visible sauf aux grossissements extrêmes. Ces spirochètes siègent en pleine réaction méningée entre les cellules; on les trouve en nids plus ou moins denses suivant les régions; ils affectionnent surtout les zones périvasculaires. Jamais on ne les décèle en plein parenchyme

cérébral. D'autres fois, les leptospires typiques sont plus rares, ils sont plus courts, leur morphologie générale est plus imprécise. Ils siègent néanmoins exactement dans les mêmes zones que précédemment. Enfin, troisième éventualité, les spirochètes sont remplacés sur les coupes nitratées par des granulations

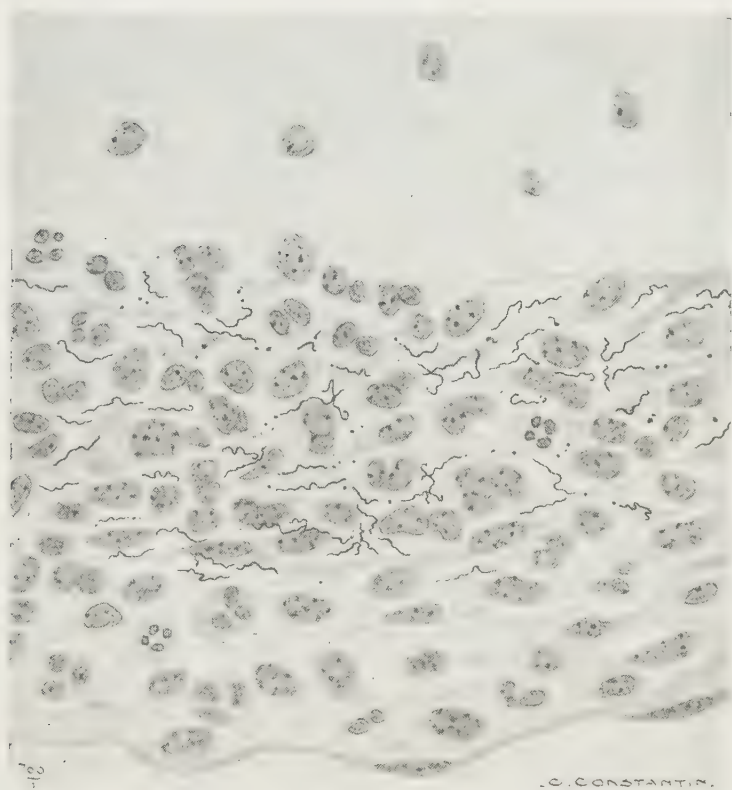


FIG. 2. — Méningite aiguë du cobaye.
Pullulation des spirochètes dans les espaces arachnoïdo-pié-mériens.

punctiformes, que l'on peut interpréter comme étant la forme granulaire du virus. Un argument en faveur de cette hypothèse est fourni par l'inoculation positive à un nouveau cobaye du même tissu cérébral.

Si l'on compare la répartition des spirochètes dans le tissu méningé avec ceux qui peuvent être décelés dans les viscères,

on voit qu'en règle générale, lorsqu'on trouve des spirochètes dans les méninges on en observe également dans le foie, le rein ou les surrénales, mais cette règle n'a rien d'absolu et l'on peut trouver une multiplication des spirochètes dans les méninges sans en trouver dans les viscères.

EXPÉRIENCE TYPE.

Cobaye 54. — 3 décembre 1931 : est inoculé sous la dure-mère crânienne avec 0 c. c. 15 d'émulsion cérébrale du cobaye 52 (cobaye qui avait reçu sous la dure-mère 0 c. c. 3 de culture du spirochète ictéro-hémorragique Verdun).

12 décembre 1931 : sacrifié mourant. Ictère, lésions hémorragiques typiques.

Histologie : Spirochètes nombreux dans les méninges.

Réaction méningée panachée — mononucléaires, polynutrophiles, globules rouges — intense et diffuse.

Spirochètes type Inada dans les reins, le foie, les surrénales.

Le lapin peut également présenter des lésions de méningite aiguë après inoculation de culture (0 c. c. 3 à 0 c. c. 5) sous la dure-mère crânienne après trépano-ponction. Il est également sensible à une inoculation intracrânienne d'une émulsion de cerveau de cobaye ou de lapin. Nous avons réussi nos expériences en nous servant de très jeunes lapins, de deux mois et demi à trois mois ; nous n'avons pas utilisé les vieux lapins, moins sensibles au virus.

Les symptômes de la maladie sont du même type que sur le cobaye. Sur un lapin cependant, la veille de la mort, nous avons assisté à une crise épileptique typique, sans que l'autopsie ait révélé de lésion cérébrale macroscopique.

L'évolution générale est plus longue et nos animaux sont morts sans ictère au bout de huit à dix jours.

Les lésions sont du même type que chez le cobaye. On obtient même plus facilement une diffusion de la méningite au niveau des plexus choroïdes et des ventricules. La réaction cellulaire est du même type, panachée, avec moyens mononucléaires, leucocytes granuleux à noyau polylobé et quelques hématies. Les spirochètes, peu nombreux, sont plus difficiles à mettre en évidence que sur certains cobayes.

EXPÉRIENCE TYPE.

Lapin C87. — Jeune lapin d'un mois.

6 janvier 1932 : inoculé sous la dure-mère crânienne avec 0 c. c. 3 d'une émulsion du cerveau du cobaye 71 bis.

11 janvier : le lapin est malade. Urines pâles, sans albumine ni pigments biliaires.

13 janvier (matin) : mort. Pas d'ictère.

Autopsie : Petites hémorragies pulmonaires. Foie congestionné. Reins et surrénales normales.

Deux ecchymoses à la face interne de la paroi abdominale.

Histologie : Méningite intense, panachée, surtout à mononucléaires. Une hémorragie sous-arachnoïdienne. Spirochètes type Inada-Ido dans les méninges. Rarissimes spirochètes dans le rein (pas dans le foie ni dans les surrénales).

Passage du cerveau au cobaye 74 : Mort du cobaye en neuf jours : ictère et hémorragies.

*
* *

Les expériences sur le cobaye et sur le lapin montrent avec quelle facilité on peut obtenir des méningites aiguës mortelles sur l'animal, accompagnées de lésions viscérales variables. L'expérimentation sur le chien et sur le singe inférieur amène à des résultats différents. Sur ces animaux, l'action pathogène du spirochète introduit directement dans le liquide céphalo-rachidien, soit par ponction sous-occipitale, soit par trépanation crânienne, donne des tableaux cliniques variables suivant la virulence de la culture et suivant la dose injectée. Les résultats les plus curieux sont sans aucun doute ceux qui se rapprochent le plus des méningites spirochétiques humaines, à savoir des méningites bénignes, souvent à rechute et suivies d'une guérison parfaite. Naturellement le tableau expérimental ne se superpose pas à la clinique humaine d'une manière absolue, mais l'évolution générale et les résultats de l'examen du liquide céphalo-rachidien au point de vue chimique et cytologique sont exactement du même type.

Voici tout d'abord trois comptes rendus d'expériences sur un chien et deux singes, qui établissent l'existence de la spirochétose méningée curable, sans rechute et avec rechute.

SPIROCHÉTOSE MÉNINGÉE CURABLE.

Chien Shangäi. — Chien jeune, séro-diagnostic Martin et Pettit négatif (M^{lle} Erber).

Est inoculé le 30 janvier 1932 sous la dure-mère crânienne avec 1 cent. cube d'émulsion cérébrale virulente du cobaye 80 (cobaye mort sans ictère, huitième passage sur l'animal depuis une culture de spirochète ictéro-hémorragique).

Pendant six jours l'animal ne présente aucun symptôme anormal et sa température ne bouge pas.

Le huitième jour : fièvre, 6 février : 39°8, *injection violente des vaisseaux conjonctivaux* aux deux yeux sans conjonctivite.

Ponction lombaire : 45 cellules au millimètre cube.

Formule cytologique :

Lymphocytes	80
Polynucléaires neutrophiles	18
Grands mononucléaires	2

Albumine C-R., en gramme par litre : 0,40.

Le séro-diagnostic est encore négatif.

La fièvre dure six jours sans qu'il y ait trace de bilirubinémie.

Apyrexie le quinzième jour de la maladie.

L'animal est sacrifié le dix septième jour. Il subsiste dans les méninges

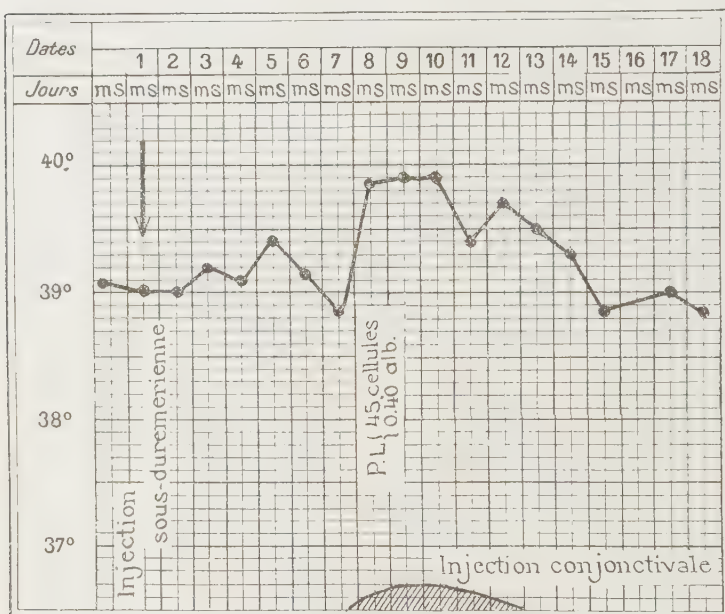


FIG. 3.

cérébrales quelques foyers de mononucléaires périvasculaires, foyers résiduels de méningite presque guérie.

SPIROCHÉTOSE MÉNINGÉE CURABLE.

Babouin 97. — Singe en pleine santé, vacciné au BCG par injection intraveineuse en octobre 1931.

Température oscillant entre 37°8 et 38°1.

Séro-diagnostic Martin-Pettit, négatif.

Liquide céphalo-rachidien : 0 cellule 3, à la cellule de Nageotte.

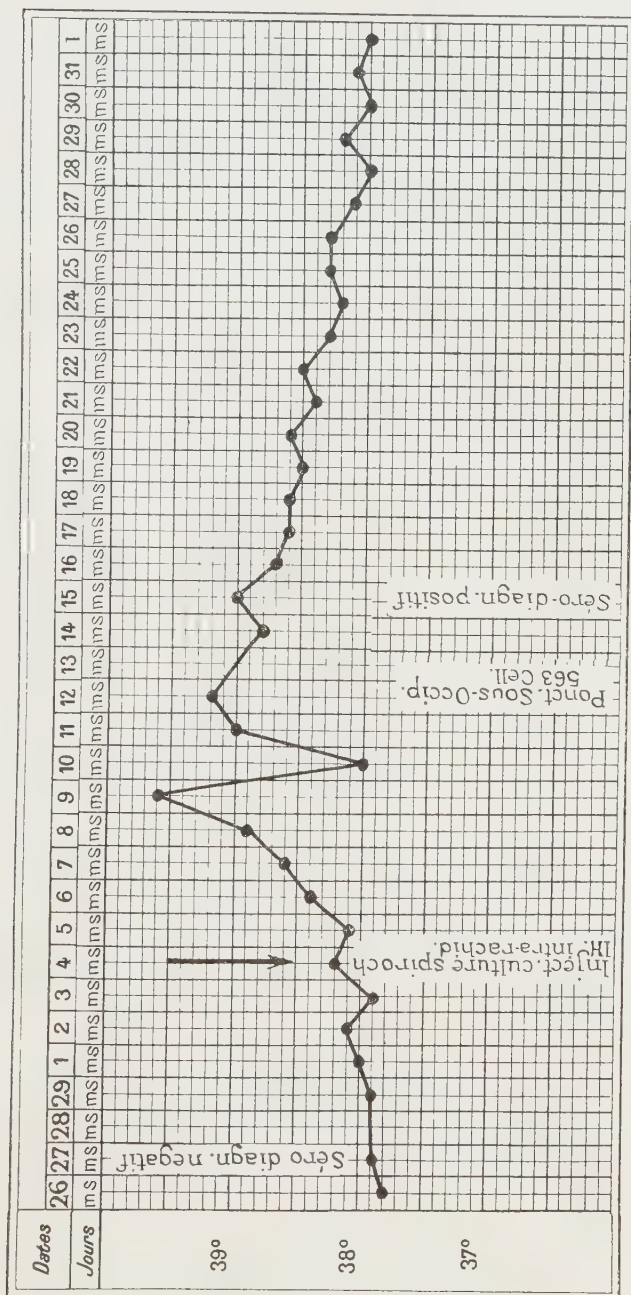


FIG. 4.

Albumine indosable.

4 mars 1932 : par voie sous-occipitale, le singe est inoculé dans les espaces arachnoïdiens avec 1 cent. cube d'une culture de cinq jours de spirochète ictéro-hémorragique, culture riche en spirochètes très mobiles.

Aucun symptôme anormal les quatre premiers jours après l'inoculation.

Période fébrile du cinquième au treizième jour pendant laquelle l'animal maigrit et reste anorexique. Une ponction sous-occipitale donne un liquide céphalo-rachidien riche en cellules (563 éléments à la cellule de Nageotte, constitués par 94 p. 100 de lymphocytes, 4 de moyens monos, 1 grand mono, 1 polynucléaire).

Le douzième jour séro-diagnostic fortement positif.

Guérison progressive par chute lente de la température, réalimentation et disparition de l'amaigrissement.

SPIROCHÉTOSE MÉNINGÉE A RECHUTES.

Babouin 96. — Singe vacciné par le BCG le 29 octobre 1931.

Subit le 11 décembre par voie intracrânienne une première inoculation discrète de virus : 0 c. c. 8 du liquide clair surnageant d'une émulsion cérébrale d'un cobaye mort d'ictère spirochétique est inoculé sans résultat apparent. Néanmoins le 22 décembre le séro-diagnostic Martin-Pettit s'élève à 4 p. 500. Pas de fièvre.

8 janvier 1932 : inoculation intracrânienne d'une émulsion laiteuse de cerveau (cobaye 72) cinquième passage sur l'animal, depuis la culture du *Sp. ictero-hemorragiæ*.

Quatre jours d'apyrexie, suivie de 3 poussées thermiques successives (à 39° seulement); amaigrissement progressif de l'animal.

Légère albuminurie sans cholurie.

Une ponction lombaire donne (28 janvier) 104 éléments à la cellule de Nageotte avec des traces d'albumine, une réduction normale de liqueur de Fehling et une réaction du benjoin colloïdal normale. La formule cytologique du liquide céphalo-rachidien donne :

Polynucléaires neutrophiles	69
Mononucléaires	29
Cellules mal différenciées	2

Le 5 février une ponction sous-occipitale donne encore 23 cellules, 7 au millimètre cube, 0,40 d'albumine et une formule presque exclusivement lymphocytaire.

Guérison progressive.

La spirochétose méningée peut d'autre part affecter une forme véritablement maligne, cachectisante. Il en était ainsi chez les chiens suivants :

SPIROCHÉTOSE MÉNINGÉE CACHECTISANTE A FORME MYOCLONIQUE.

Chien Chine ♀, jeune, séro-diagnostic Martin et Pettit négatif.

Le 6 mai, injection sous-occipitale dans le liquide céphalo-rachidien de 1 cent. cube de culture de *Sp. ictero-hemorragiæ*, très riche.

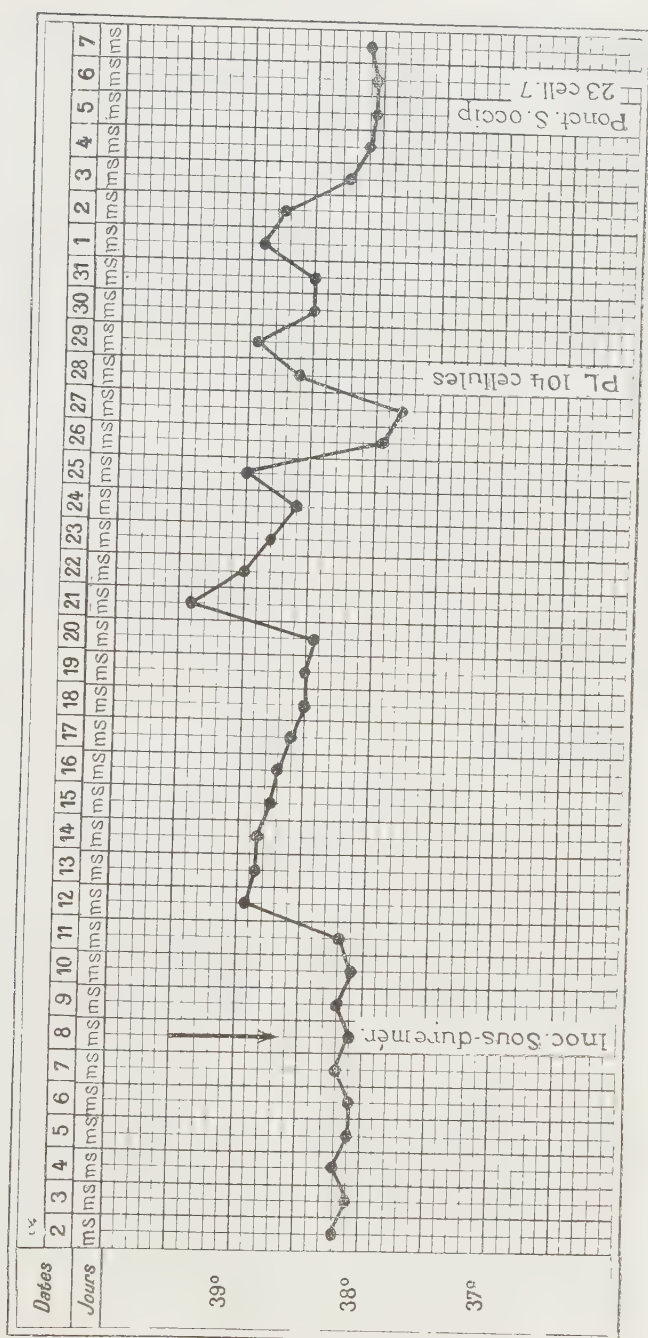


Fig. 5.

Le 7 mai, température à 40°, excellent état. Les jours suivants la température baisse à 39°4 puis à 39°2.

A partir du 11 mai, refus d'aliments, torpeur, amaigrissement progressif.

Du 11 au 14 mai, on remarque des secousses myocloniques diffuses (dents, membres), séparées de périodes de calme.

Le 14 mai, Chine est sacrifiée (éther), on note une congestion et un épaississement très net de l'arachnoïde bulbaire qui est rouge et tomenteuse sur la face antérieure.

L'examen histologique montre une méningite aiguë diffuse très intense. L'infiltrat leucocytaire massif infiltre les espaces sous-arachnoïdiens dans la région bulbaire, aussi bien qu'au niveau des circonvolutions cérébrales. L'infiltrat cellulaire est constitué en général par des monocytes, mais il y a des plages où les polynucléaires neutrophiles prédominent nettement, au milieu de placards fibrinoides. Il a même été vu une cellule quadrinucléée au fond d'une scissure en pleine réaction méningée.

SPIROCHÉTOSE MÉNINGÉE MAL'GNE.

Chien Japon ♂, jeune, séro-diagnostic Martin-Pettit négatif.

6 mai, reçoit dans le liquide céphalo-rachidien, par voie sous-occipitale, 1 c. c. 5 de culture de *Sp. ictero-hemorrhagix*. Choc immédiat, se remet progressivement. Rien les premiers jours.

Du 12 au 14 mai, amaigrissement massif. Du 14 au 16, légère amélioration.

Le 18 mai, une ponction sous-occipitale ramène un liquide clair avec 137,9 éléments cellulaires au millimètre cube.

Formule cytologique :

Polynucléaires	20
Moyens mononucléaires	10
Lymphocytes	70

Le 20 mai, l'animal, incapable du moindre mouvement, sauf de rouler couché sur son axe, cachectisé à l'extrême (son système musculaire absolument atrophié), sans trace de cholurie (ni sels, ni pigments) est sacrifié à l'éther.

L'examen histologique montre des lésions massives des reins; avec plages de cytolysse massive à côté de tubuli presque intacts avec bordure en brosse conservée, des infiltrats polynucléés dans la rate, un aspect vésiculeux de quelques cellules des travées hépatiques. Par contre l'examen du système nerveux ne décèle que fort peu de lésions méningées, malgré la réaction cellulaire du liquide cérébro-spinal, prélevé plusieurs jours auparavant.

Chez le chien et chez le singe la spirochétose méningée peut par conséquent rester comme chez l'homme rigoureusement anictérique. Elle peut affecter une forme bénigne ou une forme maligne cachectisante.

Bénigne, elle se caractérise par une courbe thermique assez typique, par une injection des vaisseaux conjonctivaux et une réaction cytologique du liquide céphalo-rachidien.

La courbe thermique est caractérisée par une phase apyrétique de quatre à cinq jours, comme sur les animaux de B. Erber et J. Michaut (1) suivie d'une ou plusieurs phases fébriles peu accentuées (méningite à rechutes).

L'injection conjonctivale est bilatérale et du même type que l'injection conjonctivale de la spirochétose méningée humaine, à savoir qu'il n'y a pas trace de teinte jaunâtre des sclérotiques.

La réaction cytologique du liquide cérébro-spinal donne une augmentation du nombre des cellules pouvant largement dépasser 100 éléments à la cellule de Nageotte et s'accompagne d'une élévation du taux de l'albumine à 0,40. La formule cytologique est panachée, comportant en nombre inégal des polynucléaires, des moyens mononucléaires et des lymphocytes; ceux-ci prédominent à la dernière phase de la maladie.

Le séro-diagnostic spirochétique devient rapidement positif et l'animal guérit entièrement après deux, trois ou quatre semaines de maladie.

La forme maligne de la spirochétose méningée que nous avons observée sur le chien comporte une aggravation des symptômes généraux sans que cependant il y ait de cholémie ni de cholurie; l'amaigrissement devient rapidement formidable. Il y a littéralement une fonte globale du tissu musculaire. Du côté du système nerveux nous avons noté des paralysies véritables du train postérieur et des *myoclonies* généralisées, mâchonnements, tics faciaux, convulsions des membres, séparées par des périodes d'accalmie. Et c'est en pleine cachexie que nous avons dû sacrifier nos animaux, à la veille de leur mort.

Les lésions histologiques des méninges offrent moins de fixité et moins d'extension que les lésions du cobaye qui reste l'animal type. Néanmoins, à condition de pratiquer l'autopsie à une période favorable, nous avons pu retrouver sur le chien (exp. Chine) une méningite aiguë, diffuse, intense, caractérisée par un épaississement de l'arachnoïde et histologiquement par une infiltration massive arachnoïdo-piemérienne par des mononucléaires et des polynucléaires.

Cette réaction méningée panachée est donc la règle en

(1) B. ERBER et G. MICHAUT, Spirochétose expérimentale du singe. *S. B.*, 109 5 mars 1932, p. 707.

matière de spirochétose méningée, qu'il s'agisse du chien, du singe, du cobaye ou du lapin.

* * *

L'expérimentation sur l'animal, cobaye et lapin, chien et singe, amène donc à des conclusions générales analogues à celles que provoque l'étude des méningites anictériques humaines.

Le *Spirochæta ictero-hémorragiæ* d'Inada et Ido, le plus typique, entretenu en culture depuis une quinzaine d'années, est capable de provoquer par inoculation dans le liquide céphalo-rachidien une méningite aiguë du même type que les méningites humaines spontanées avec une réaction cellulaire panachée identique.

Ces faits doivent être tout particulièrement retenus à l'heure actuelle, depuis que l'on étudie, en dehors de l'ictère, les maladies aiguës provoquées par l'introduction dans l'organisme des spirochètes pathogènes. Nos observations sur l'homme, nos expériences sur les animaux ont permis d'établir sur une base solide le méningo-tropisme du spirochète d'Inada et Ido et la réalité aussi bien clinique qu'expérimentale de la spirochétose méningée.

CONCLUSIONS.

1° L'inoculation sous-dure-mérienne de culture du *Sp. ictero-hémorragiæ* provoque chez le cobaye une méningite aiguë mortelle accompagnée ou non d'ictère.

2° Cette méningite aiguë se caractérise anatomiquement par une réaction cellulaire panachée (mononucléaires et polynucléaires) et s'accompagne souvent d'une pullulation locale des spirochètes.

3° Le lapin jeune peut présenter le même type de méningite aiguë, avec réactions cellulaires identiques.

4° Le chien jeune peut présenter deux types morbides, une méningite bénigne curable, une méningite maligne cachectisante.

La forme bénigne se caractérise par une incubation apyrétique de six à huit jours, et par période fébrile d'un septenaire suivie de guérison.

La forme maligne se caractérise par une cachexie précoce et des myoclonies diffuses.

Toutes deux s'accompagnent d'une hypercyclose du liquide céphalo-rachidien et d'une élévation du taux de son albumine.

5° Le singe inférieur est sensible au virus injecté dans le liquide céphalo-rachidien. Après une courte période d'incubation il fait une maladie fébrile avec amaigrissement, sans ictère. Le liquide céphalo-rachidien montre une réaction méningée panachée.

6° L'expérimentation sur l'animal comme l'observation clinique sur l'homme montre ainsi la réalité de la *Spirochétose méningée anictérique*, provoquée par le même spirochète que celui de l'ictère infectieux.

*Institut Pasteur (Laboratoire de la Sîngerie)
et Faculté de Médecine
(Laboratoire de Pathologie expérimentale).*

ETUDE DES RÉACTIONS VASCULAIRES SUR LES ORGANES ISOLÉS

par V. ZERNOFF.

L'étude expérimentale du rôle des vaisseaux sanguins présente un intérêt capital. Dans la littérature scientifique on trouve un grand nombre de travaux traitant cette question. Cependant, jusqu'à ces derniers temps, les résultats obtenus ont été insuffisants. C'est l'absence d'une technique simple et précise qui rendait ces expériences incertaines et peu démonstratives. On a proposé plusieurs méthodes, mais toutes avaient leurs défauts.

Läwen (1) et Trendelenbourg (2) ont fait des expériences avec des extrémités isolées de grenouilles. La méthode exige une préparation extrêmement délicate. D'autre part, les vaisseaux des animaux à sang froid réagissent tout à fait autrement que ceux des mammifères; de plus, après un certain temps, le tissu musculaire des extrémités isolées est imbibé d'une solution physiologique qui passe dans les vaisseaux et devient œdémateux.

Frey et Meyer (3) ont employé une technique beaucoup plus simple. On coupe un morceau d'artère ou de veine en forme de ruban. On suspend ce vaisseau découpé et on attache à son bout inférieur un petit poids, de telle sorte que ce ruban soit tendu. Puis on le plonge dans un bocal contenant de la solution physiologique de Ringer-Locke. En ajoutant à celle-ci différentes substances on peut étudier leur influence sur la contraction des vaisseaux. Le défaut principal de cette technique consiste dans l'impossibilité d'employer les petits vaisseaux. D'autre part, ils sont toujours altérés par la dissection, et la solution à examiner ne pénètre pas dans les vaisseaux par les voies natu-

(1) LÄWEN, *Archiv. f. exp. Pathol. u. Pharmacol.*, **51**, 1904.

(2) TREDELENBOURG, *Arch. f. d exp. Pathol. u. Pharmacol.*, **63**, 1910.

(3) MEYER, *Zeitschr. f. Biol.*, **48**, 1906.

relles (c'est-à-dire par les *vasa vasorum*), mais elle les imbibe à travers les parois découpées.

La méthode de Pissemsky-Krawkow (1), simple et précise, évite tous les défauts mentionnés. Ces auteurs ont proposé de faire des expériences sur les vaisseaux de l'oreille isolée du lapin. La structure anatomique de cet organe, ainsi que les conditions physiologiques dans lesquelles il se trouve, le rendent extrêmement propice aux expériences avec ses vaisseaux après qu'il a été excisé. L'oreille du lapin est un cartilage plat, couvert de peau. Elle ne contient presque pas de muscles, sauf près de la base où on en trouve une couche faiblement développée. L'artère auriculaire postérieure (branche de la carotide) qui irrigue l'oreille est placée directement sous la peau. Pendant la vie du lapin, l'état de cette artère dépend des conditions extérieures (température, agents chimiques, lésions, etc.). En même temps, la quantité de sang nourrissant l'oreille varie dans des limites assez étendues. Pour ces raisons, l'oreille, étant un organe très résistant, peut supporter des conditions défavorables et doit être apte à la survie plus que tout autre organe.

Cette méthode a subi quelques modifications. En général, on prend un lapin de poids moyen. On fixe l'animal sur le ventre, puis on cherche l'artère postérieure de l'oreille qui passe entre deux éminences par une petite gouttière à la base de l'oreille. On pratique une petite incision et on fait deux ligatures à l'artère, en laissant libres la veine et le nerf. Alors, avec des forts ciseaux on coupe l'oreille entre ces deux ligatures, et dans l'artère de l'oreille isolée on introduit une canule très fine. Au moyen d'une seringue, sous une pression légère, on lave les vaisseaux avec du liquide de Ringer-Locke, on place cette oreille sur un plateau de verre de forme pentagonale, qu'on fixe incliné à 45°, de façon que le liquide, qui entre dans l'artère de l'oreille et sort par les veines, puisse tomber librement goutte à goutte d'un coin de ce plateau dans un cylindre de verre.

On fait circuler le liquide dans les vaisseaux de l'oreille à l'aide d'un appareillage très simple (voir fig. 4). Il consiste en

(1) PISSEMSKY. *Rousski vratch*, 1.° 12, 1912.

deux vases de Mariotte, fixées sur les supports à 40 centimètres au-dessus du plateau où est l'oreille. Dans l'un on met du liquide pur de Ringer-Locke, et dans l'autre on ajoute de la substance à examiner. Au moyen de tubes de caoutchouc, le liquide de ces vases peut passer à travers des serpentins de verre placés dans un récipient avec de l'eau, dont la température est maintenue au degré voulu. Après avoir traversé les serpentins, le liquide passe par de courts tubes de caoutchouc dans un tube de verre en forme de T, dont le bout est adapté à la canule de l'oreille. A l'aide de pincès, on peut

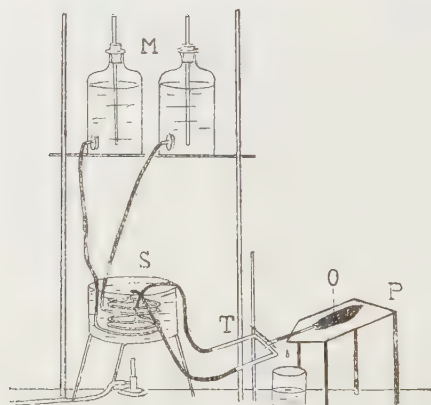


FIG. 1. — O, oreille de lapin; P, plateau de verre; T, tube de verre en forme de T; S, serpentins; M, vases de Mariotte.

laisser pénétrer dans les vaisseaux de l'oreille tantôt le liquide d'un vase, tantôt celui de l'autre.

Selon les expériences, on peut facilement modifier cet appareillage. En changeant la hauteur des vases de Mariotte sur le socle, on peut modifier la pression du liquide dans les vaisseaux isolés. Pour les expériences sur les vaisseaux d'organes plus délicats (reins, foie, poumons, etc.), on fait passer de l'oxygène dans le liquide de Ringer-Locke. On peut aussi mettre l'organe isolé dans une étuve spéciale et maintenir ainsi une température extérieure constante. La plupart de nos expériences ont été faites à la température du laboratoire, le liquide de Ringer-Locke n'était pas chauffé non plus, et nous n'avons pas utilisé d'oxygène.

Un certain temps après séparation de l'oreille, on peut observer un spasme assez prononcé des vaisseaux. Il ne sort que de I à IV gouttes de liquide par minute. Mais au bout de trente minutes à une heure le nombre de gouttes s'accroît et atteint un chiffre plus ou moins constant. Alors, en comptant les gouttes qui tombent du plateau, on peut étudier les contractions et les dilatations des vaisseaux d'une manière très précise. Si les veines sont obstruées, ou si l'on veut étudier le fonctionnement des artères seulement, on coupe le bout de l'oreille et le liquide sort de l'artère sans passer par les capillaires et les veines.

Krawkow (1) a employé la même méthode pour les expériences avec les doigts humains et les artères coronaires dont le muscle avait été paralysé par le strophantus. Plus tard (2), il a décrit la méthode d'application de cette technique aux expériences sur différents organes et notamment sur des glandes à sécrétion interne. Récemment, Friedberger (3) a entrepris une série d'expériences sur les extrémités postérieures isolées de cobayes. Sa méthode peut être employée aussi bien avec des extrémités isolées de rats. Après avoir saigné à blanc l'animal, on lui ouvre l'abdomen; le rectum, la vessie, l'utérus ou les testicules doivent être ligaturés et coupés. Puis on met deux ligatures à l'aorte abdominale et à la veine cave inférieure.

On coupe en deux le corps de l'animal entre ces deux ligatures, et toute la partie inférieure sert alors pour l'examen des vaisseaux isolés « Gefässpreparat ». On introduit dans l'aorte une canule de verre, on la remplit ensuite à l'aide d'une pipette avec du liquide de Ringer-Locke, en prenant soin qu'il n'entre pas de bulles d'air dans le système vasculaire. Puis, en enlevant les ligatures des veines, on porte la préparation sur un plateau de verre incliné. On réunit la canule avec le système de vases de Mariotte et on peut opérer exactement comme dans la méthode de Pissemsky-Krawkow.

Ces deux méthodes ont leurs avantages et leurs inconvénients. Celle de Friedberger fait que, parfois, les muscles du

(1) KRAWKOW. *Zeischr. f. d. g. exp. Med.*, 27, 1922.

(2) KRAWKOW. *Vratchebnoe Delo*, n° 24-26, 1923.

(3) FRIEDBERGER. *Zeilschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Ther. B.* 51, 1927.

cobaye s'imbibent assez vite de liquide et deviennent œdémateux, ce qui diminue la netteté des réactions. Certains produits pharmacologiques (comme par exemple la caféine) en solutions concentrées peuvent avoir une action coagulante sur les muscles, et, de cette manière, rendre impossible la circulation dans les vaisseaux. C'est pour ces raisons que les tissus sans muscles peuvent être considérés comme un matériel de choix pour des études expérimentales sur les vaisseaux isolés. D'autre part, l'oreille du lapin permet de faire un grand nombre d'expériences très intéressantes. On peut étudier plus facilement l'influence de la température et des conditions extérieures sur la réaction des vaisseaux. Enfin, l'oreille isolée du lapin peut être conservée assez longtemps et ainsi on peut étudier la survie des vaisseaux isolés.

Les deux méthodes ouvrent un vaste champ d'expérience. On peut les appliquer :

1° A l'étude des réactions physiologiques des vaisseaux et de leurs relations avec les conditions extérieures;

2° A l'étude de la survie des organes et des tissus isolés (vaisseaux);

3° A l'étude de l'action des agents microbiens et des réactions vasculaires dans l'immunité;

4° A l'étude de l'action des substances pharmacologiques;

5° A l'étude et à la préparation des produits des glandes à sécrétion interne.

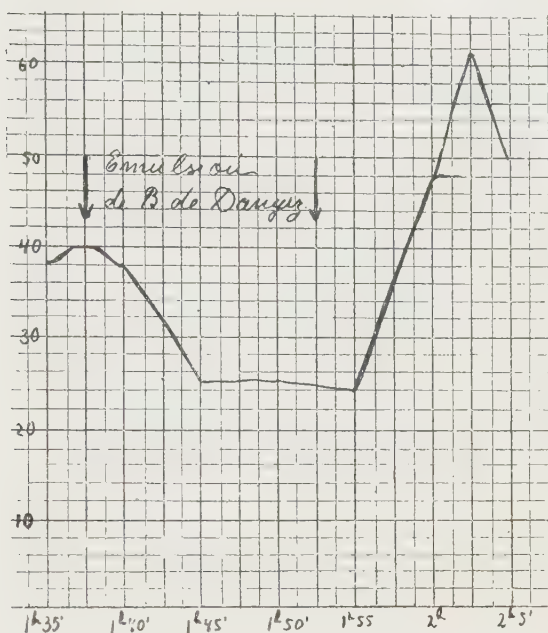
Le but de nos travaux était l'étude expérimentale des réactions des vaisseaux sur les différents produits microbiens et de leur rôle dans le choc anaphylactique.

Nos premières expériences ont été consacrées à l'étude de l'action des cultures microbiennes sur le système vasculaire périphérique.

ACTION DES CULTURES MICROBIENNES.

Dans ce but, dans les vaisseaux des oreilles isolées, nous avons fait passer des cultures chauffées (une heure à 60°) de vibron cholérique et des émulsions diluées de culture du microbe de Danysz non chauffée.

Les vaisseaux réagissaient par de très faibles contractions au

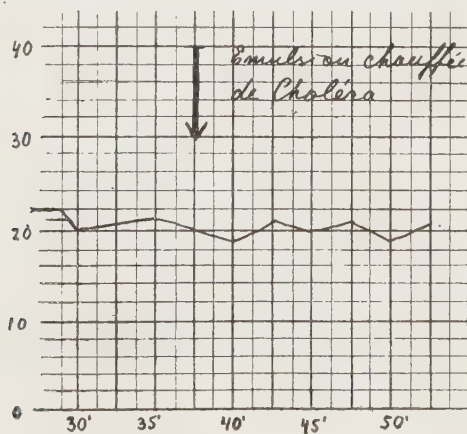


COURBE 1. — Oreille de lapin.

Passage de l'émulsion diluée du microbe de Danysz.

En ordonnée : Nombre de gouttes sortant de l'oreille en une minute.

En abscisse : Temps écoulé après le commencement de l'expérience.

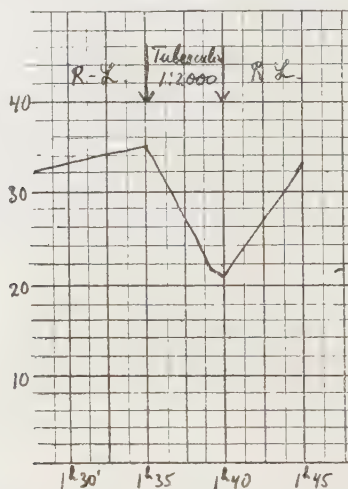


COURBE 2. — Oreille de lapin. Passage de l'émulsion chauffée de v. cholériques

passage des microbes de Danysz non chauffés (voir courbe 1). D'autre part, nous n'avons observé aucun changement après l'introduction de la culture chauffée de vibrions cholériques (voir courbe 2).

ACTION DE LA TUBERCULINE.

Nous avons aussi entrepris plusieurs expériences avec la tuberculine. Ici, nous avons pu obtenir des contractions assez régulières des vaisseaux, mais, d'autre part, ces contractions



COURBE 3. — Oreille de lapin.
Passage de la tuberculine en dilution 1 p. 2.000.

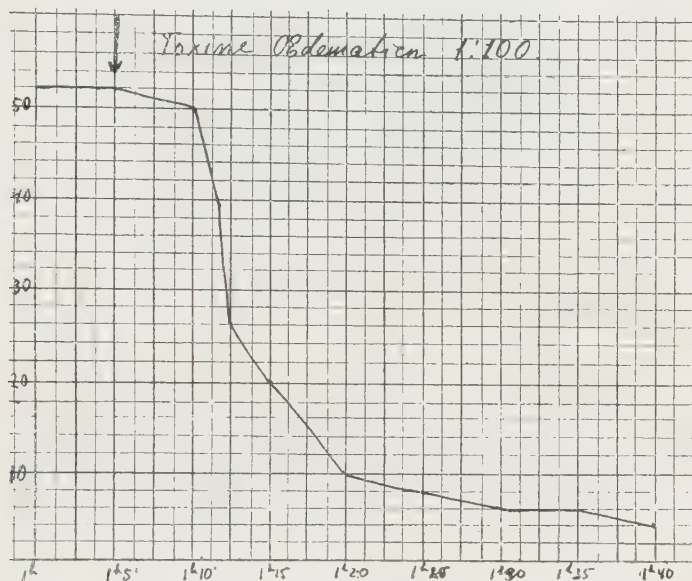
étaient toujours très faibles. Pour provoquer des réactions plus marquées, nous avons préparé des solutions de tuberculine assez concentrées (1 p. 100, 1 p. 2.000). La courbe 3 montre la réaction vasculaire d'une oreille isolée de lapin à la tuberculine en diluée à 1 p. 2.000.

Friedberger et Seidenberg (1) ont obtenu des résultats analogues avec la tuberculine en faisant ces expériences sur les extrémités isolées de cobayes.

(1) FRIEDBERGER et SEIDENBERG. *Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Ther.* B. 51, 1927.

ACTION DES TOXINES.

Nous avons entrepris une série d'expériences pour étudier l'action des toxines. Plusieurs expériences avec les toxines diphtérique, tétanique et œdématisante faites sur des oreilles isolées de lapins et les extrémités de cobayes nous ont montré que les vaisseaux réagissaient par une forte contraction à l'intro-



COURBE 4. — Oreille de lapin.
Passage de la toxine œdématisante en dilution 1 p. 100.

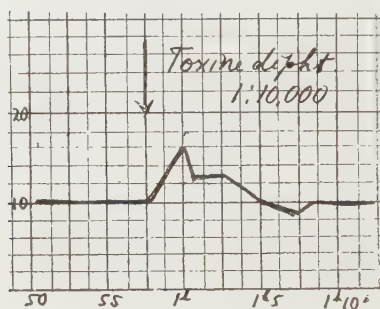
duction de ces toxines. Ici nous citons, comme exemple, une de nos nombreuses expériences :

EXPÉRIENCE : L'oreille droite du lapin N a été isolée le 20 mars à 15 heures; une heure après, dans les vaisseaux de cette oreille, on a fait circuler du liquide de Ringer-Locke. Vers 17 heures le nombre de gouttes sortant des veines de l'oreille a été constant : LII en une minute. Alors, nous avons fait passer la toxine œdématisante diluée 1 p. 100. Six minutes après, le nombre de gouttes était de XLII; quatre minutes plus tard, il n'y en avait que XX, et cinq minutes après seulement X. La contraction des vaisseaux augmentait toujours et ainsi jusqu'à la fin de l'expérience (voir la courbe 4).

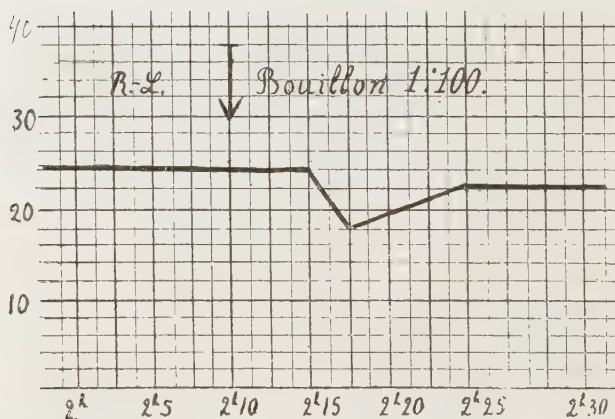
Les mêmes résultats ont été obtenus avec les autres toxines

mentionnées. Mais il est intéressant de noter que des dilutions plus faibles ne provoquent pas de réactions vasculaires aussi violentes et que la toxine diphtérique en dilution 1/10.000 n'a aucune action sur les vaisseaux isolés (voir la courbe 5).

Puisque toutes les toxines étaient à base de bouillon, nous

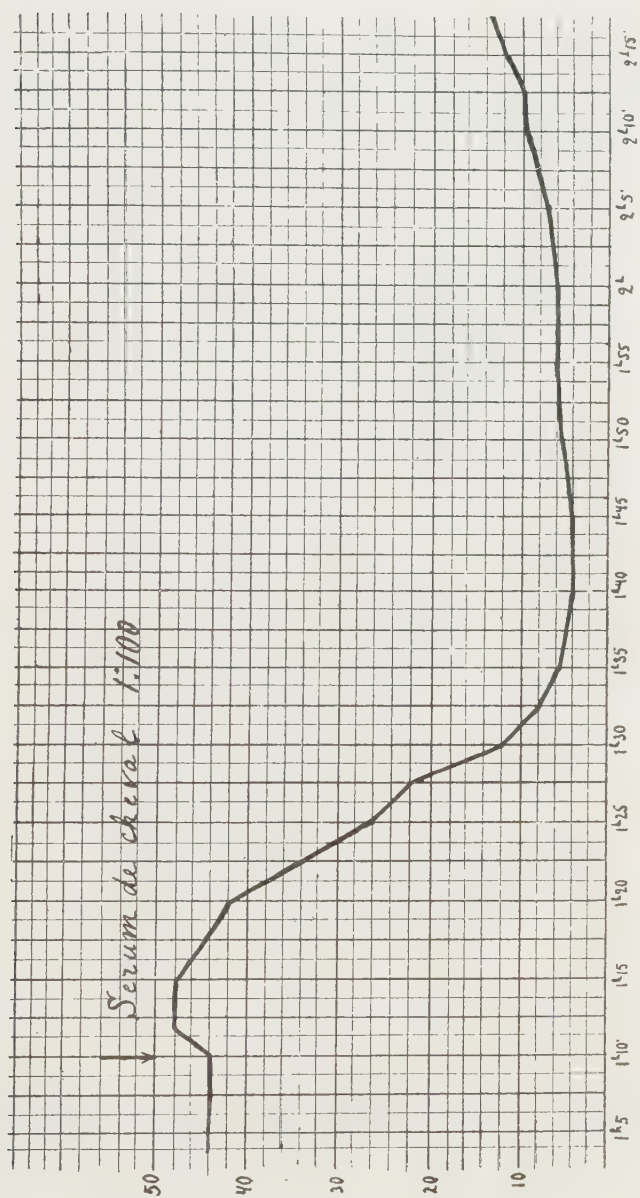


COURBE 5. — Oreille de lapin.
Passage de la toxine diphtérique en dilution 1 p. 10.000.



COURBE 6. — Extrémités de cobaye.
Passage du bouillon ordinaire en dilution 1 p. 100.

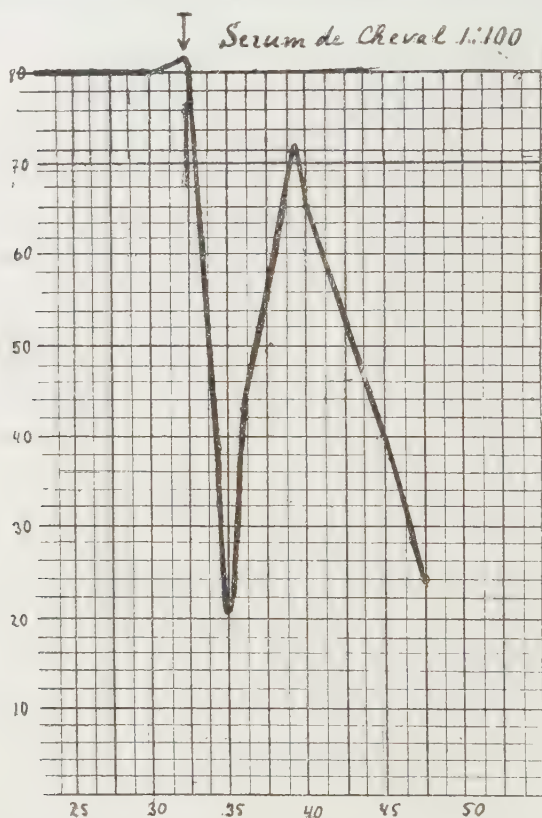
avons cru intéressant d'étudier l'action du bouillon ordinaire sur les réactions vasculaires du lapin et du cobaye. La courbe ci-dessous (voir courbe 6) nous montre que le bouillon dilué à 1/100 provoque une *faible* contraction des vaisseaux.



Courbe 7. — Oreille du lapin sensibilisé. Passage du sérum de cheval en dilution 1:100.

CHOC ANAPHYLACTIQUE.

La méthode des vaisseaux isolés permet une étude intéressante du mécanisme intime du choc anaphylactique. Plusieurs auteurs, comme Widal, Kopaczewski, Doerr et autres ont émis



COURBE 8. — Oreille du lapin sensibilisé.
Passage du sérum de cheval en dilution 1 p. 100.

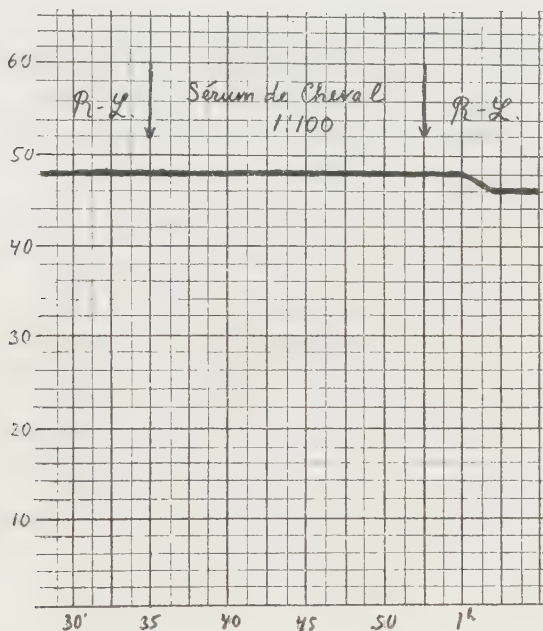
une théorie selon laquelle tout le mécanisme du choc se passe dans le système vasculaire. D'autre part, Friedberger, Schürer et d'autres attribuent un rôle important à la chute de la tension artérielle, causée par la dilatation des vaisseaux périphériques.

Friedberger et Seidenberg (1) ont déjà démontré sur des

(1) FRIEDBERGER et SEIDENBERG. *Zeitschr. f. Immun. u. exp. Ther.* B. 51, 1927.

vaisseaux isolés le rôle important des réactions vasculaires dans le choc anaphylactique.

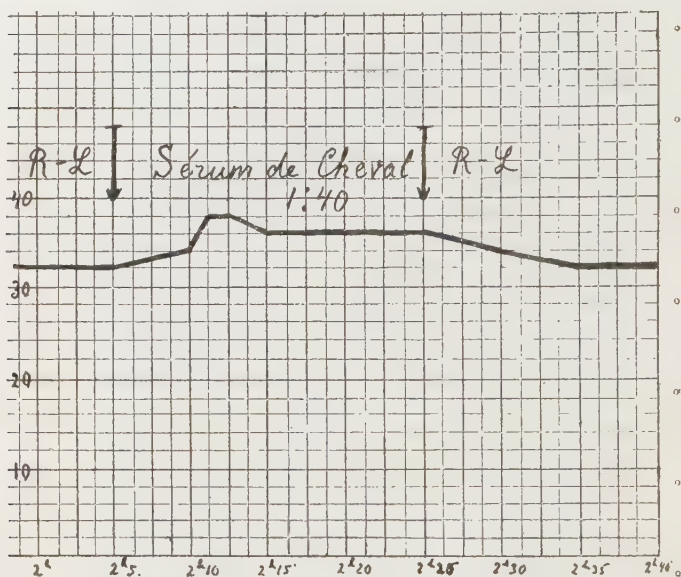
Dans une série d'expériences, nous avons étudié le choc anaphylactique sur les vaisseaux périphériques isolés. Dans ce but, plusieurs lapins et cobayes ont été sensibilisés au moyen du sérum frais de cheval. D'autres ont été sensibilisés avec du sérum antitétanique de l'Institut Pasteur. Les injections pré-



COURBE 9. — Oreille du lapin non sensibilisé.
Passage du sérum de cheval en dilution 1 p. 100.

parantes ont été faites aux lapins dans la veine de l'oreille et aux cobayes dans la veine jugulaire. Après un délai de trois à six semaines, nécessaire pour la sensibilisation, ces animaux ont été sacrifiés. Pour éviter toute influence étrangère qui aurait pu diminuer ou masquer l'effet du choc, nous avons coupé les oreilles des lapins sans narcose à l'éther. Après l'installation du système de circulation artificielle et un lavage des vaisseaux assez prolongé pour que le nombre de gouttes sortant des veines soit constant, nous avons fait passer

la solution d'antigène (sérum de cheval) à 1/100. Dès que cette solution pénètre dans les vaisseaux, on observe une forte diminution de la quantité de liquide sortie des veines (voir les courbes 7 et 8). Il se produit toujours une contraction violente des vaisseaux périphériques et nous avons observé cette réaction dans tous les cas de choc anaphylactique expérimental sur les vaisseaux isolés. Cependant la force de contraction n'est



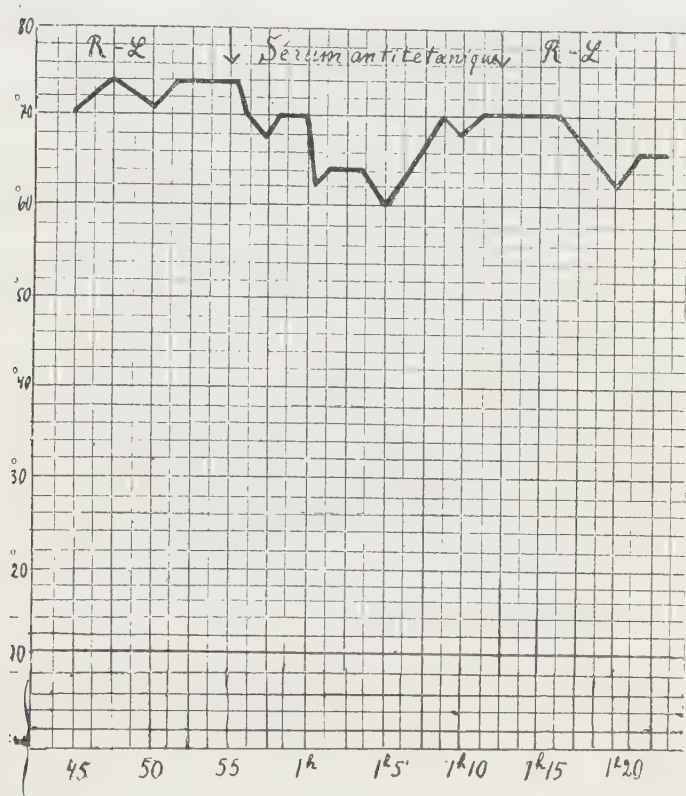
COURBE 10. — Oreille du lapin non sensibilisé.
Passage du sérum de cheval en dilution 1 p. 40.

pas toujours la même et également la forme de la courbe donnée par le choc varie sensiblement.

Ici nous donnons deux courbes représentant des contractions vasculaires dans le choc anaphylactique *in vitro*. Ces chocs ont été produits par le passage du sérum de cheval à 1 p. 100 dans les vaisseaux des oreilles isolées de lapins. La courbe 7 représente une dilatation primitive que suit aussitôt une contraction plus ou moins lente, mais assez forte. La courbe 8 représente une contraction très brusque, puis une courte dilatation et de nouveau une forte contraction.

En même temps, nous avons fait des expériences avec des

oreilles isolées de lapins témoins (non sensibilisés). Le passage du sérum, même en dilutions plus fortes, ne donne pas de contractions vasculaires. Quelquefois le sérum provoquait des dilatations passagères de ces vaisseaux (voir les courbes 9 et 10). Les vaisseaux des animaux sensibilisés avec



COURBE 11. — Extrémités du cobaye sensibilisé avec du sérum antitétanique. Passage du sérum antitétanique en dilution 1 p. 100.

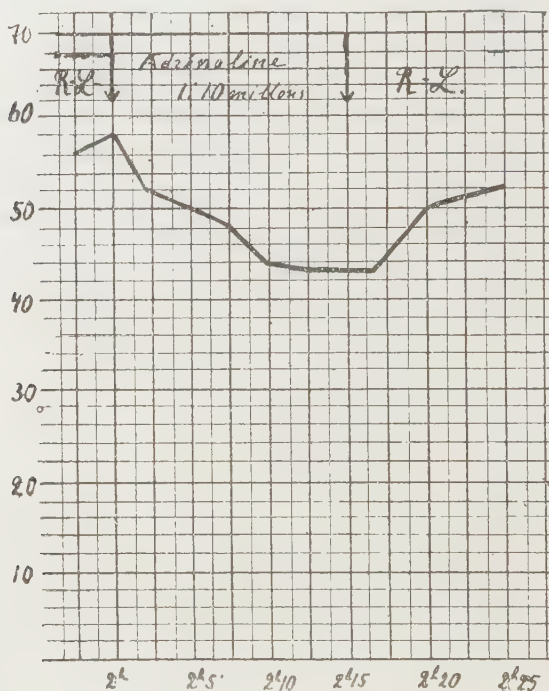
du sérum antitétanique de l'Institut Pasteur réagissaient beaucoup plus faiblement après le passage de ce sérum que les vaisseaux des animaux préparés avec du sérum frais (voir la courbe 11).

LA SENSIBILITÉ.

Il faut noter que la sensibilité des vaisseaux n'est point cons-

tante, elle dépend de plusieurs causes qu'il est souvent très difficile de les déterminer.

Nous avons observé que certaines oreilles isolées ne donnaient aucune réaction avec plusieurs agents pharmacologiques; d'autres, dès le début de l'expérience, présentaient un spasme assez prononcé et devenaient oedémateuses, tandis que des



COURBE 12. — Oreille de lapin.
Passage de l'adrénaline en dilution 1 p. 10.000.000.

oreilles préparées par la même méthode donnaient des résultats excellents.

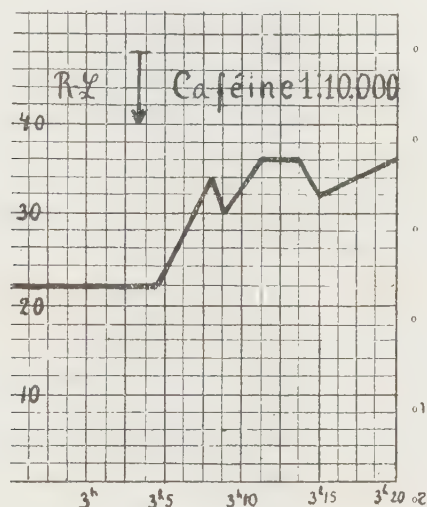
LES LIMITES DE LA SENSIBILITÉ.

Il est également difficile d'établir les limites de la sensibilité des vaisseaux isolés et de déterminer pour les différentes substances les doses minimales, qui provoquent encore des réactions vasculaires. Krawkow (1) a trouvé des dilutions tout à

(1) KRAWKOW. *Zeitschr. f. d. g. exp. Med.*, 34, 1923.

fait remarquables, provoquant des variations dans le débit vasculaire. Ainsi certaines substances (comme l'adrénaline) diluées 10^{-24} — 10^{-32} provoqueraient, d'après cet auteur, des contractions vasculaires.

Sans employer une technique aussi fine (c'est-à-dire sans appareil-étuve, sans passage d'oxygène et sans chauffer le liquide de Ringer-Locke), nous avons obtenu des résultats assez nets avec la solution d'adrénaline 1/10.000.000 (voir la courbe 12). La solution de 1/100.000.000 donnait des contrac-



COURBE 13. — Extrémités de cobaye.
Passage de la caféine en dilution 1 p. 10.000.

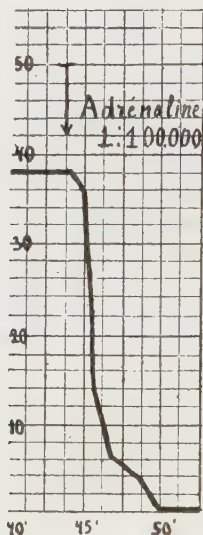
tions peu prononcées. D'habitude, pour contrôler la sensibilité des vaisseaux, nous employons des solutions de 1 p. 1.000.000 à 1 p. 100.000; des solutions plus fortes provoquent des spasmes prolongés qui nuisent à la bonne marche de l'expérience.

La caféine de 1 p. 1.000 à 1 p. 10.000 provoque des vasodilatations très marquées (voir courbe 13).

La mort de l'organe isolé se manifeste par la diminution de la sensibilité des vaisseaux (celle-ci peut être contrôlée avec de l'adrénaline) et par le développement consécutif de l'œdème. La courbe 14 représente la réaction vasculaire contre l'adré-

naline à 1/100.000, six heures après la séparation de l'oreille. La courbe 15 représente la réaction vasculaire de la même oreille sur la même dose d'adrénaline, mais seulement quelques heures plus tard.

La courbe 16 représente la réaction de l'oreille après le passage de la caféine. La courbe 17 montre la réaction de la même oreille pour la même dose de caféine, mais vingt-quatre heures plus tard. Déjà vingt-quatre heures après l'excision, l'oreille



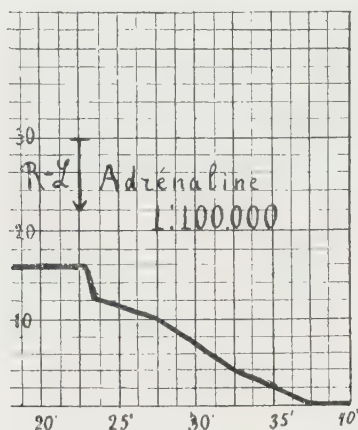
COURBE 14. — Oreille de lapin.
Passage de l'adrénaline en dilution 1 p. 100.000.

ne donne pas de réactions nettes à l'introduction de la caféine. Mais, d'autre part, dans la plupart de nos expériences, nous avons constaté une aptitude tout à fait remarquable de survie très prolongée des vaisseaux.

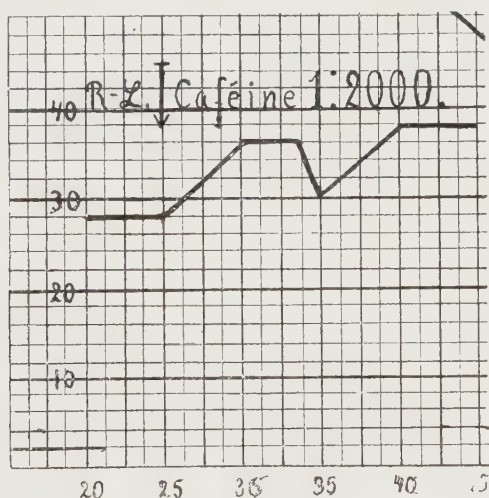
Pendant un certain temps, n'ayant pas assez de lapins pour nos expériences, nous avons essayé de poursuivre nos travaux avec des oreilles de lapins tués dans une boucherie. Nous prenions ces oreilles aussitôt après la mort de l'animal. Une heure, une heure et demie après la mort de l'animal, les oreilles pouvaient être employées.

Comme exemple, nous pouvons prendre l'oreille d'un lapin

tué dans une boucherie le 25 octobre 1927 à 9 heures du matin. Une heure trente minutes plus tard elle a été mise en



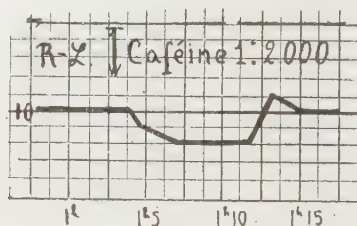
COURBE 15. — Même oreille que dans la courbe 14. Passage de l'adrénaline en dilution 1 p. 100.000, mais seulement quelques heures plus tard.



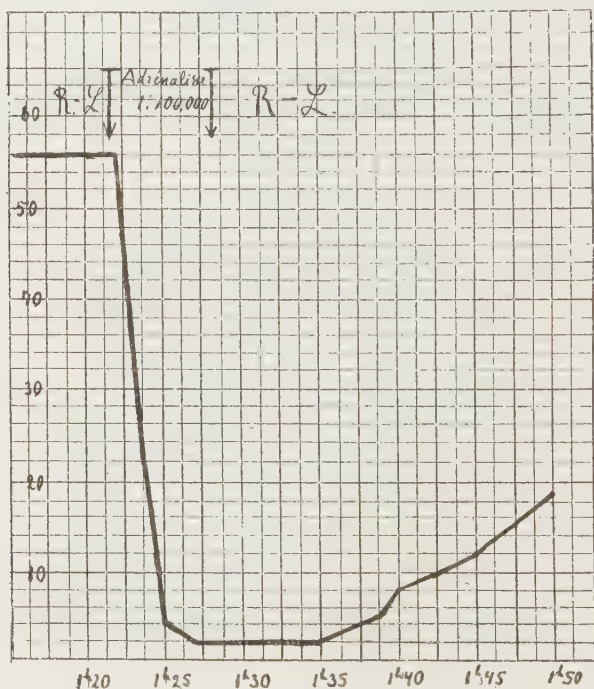
COURBE 16. — Oreille de lapin.
 Passage de la caféine en dilution 1 p. 2.000.

expérience. Après une heure vingt-deux minutes de circulation artificielle, on y a fait pénétrer une solution d'adrénaline (1 pour

100.000 dans le liquide de Ringer-Locke). Le nombre de gouttes était environ de LV-LX en une minute avant le passage de l'adrénaline et, cinq minutes après, ce nombre se réduit à II



COURBE 17. — Même oreille que dans la courbe 16. Passage de la caféine en dilution 1 p. 2.000, mais vingt-quatre heures plus tard.

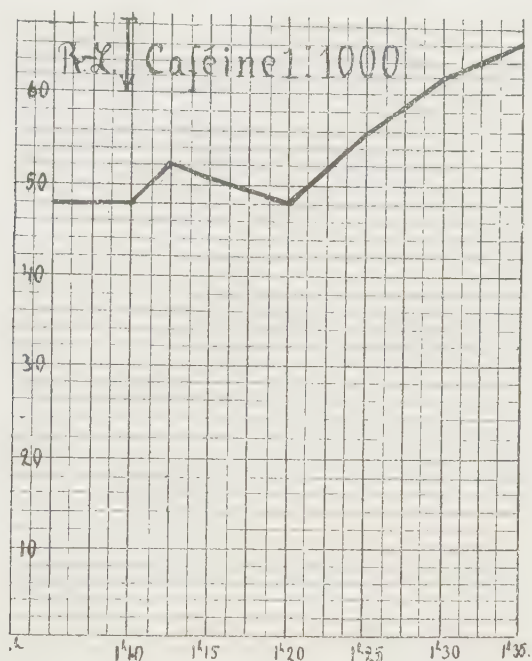


COURBE 18. — Oreille du lapin tué dans une boucherie. Passage de l'adrénaline en dilution 1 p. 100.000.

en une minute. Aussitôt on a fait passer de nouveau le liquide de Ringer-Locke et, vingt-deux minutes plus tard, la quantité

de liquide traversant les vaisseaux augmenta jusqu'à XIX gouttes en une minute (voir la courbe 18).

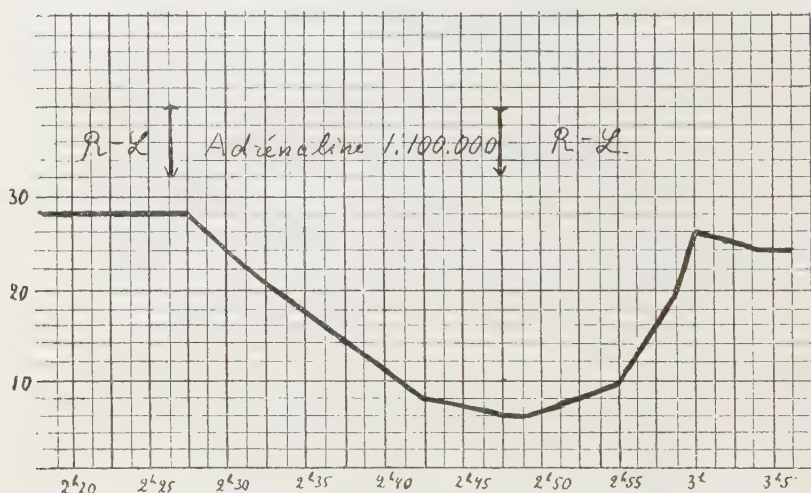
D'habitude, nous faisons nos expériences sur un même organe pendant deux jours. La nuit, l'organe est conservé dans la glacière à la température d'environ 4°. Comme nous l'avons déjà noté, le deuxième jour la sensibilité des vaisseaux diminue, mais le degré de cette diminution dépend de plusieurs facteurs. Souvent nous avons pu prolonger nos études sur un



COURBE 19. — Extrémités de cobaye. Six jours après l'excision.
Passage de la caféine en dilution 1 p. 1000.

même organe pendant un temps beaucoup plus long. Ici nous donnons comme exemple la courbe 19 des réactions vasculaires des extrémités d'un cobaye, six jours après l'excision. Les oreilles isolées de lapins étant plus commodes à conserver montraient des signes de survie pendant un temps plus prolongé. Ainsi, une fois nous avons pu poursuivre nos expériences sur une même oreille, pendant dix-huit jours. Le temps total de la circulation artificielle du

liquide dans les vaisseaux de cette oreille a été de vingt et une heures. Les vaisseaux d'une autre oreille réagissaient à l'introduction d'une solution d'adrénaline treize jours après l'amputation par des contractions tout à fait nettes. C'était l'oreille d'un lapin mort d'une intoxication indéterminée. Seulement deux heures après sa mort l'oreille avait été coupée, la canule introduite dans l'artère et les vaisseaux lavés; puis l'oreille avait été mise à la glacière. Treize jours après, on l'a portée à la température du laboratoire; une heure après,



COURBE 20. — Oreille de lapin treize jours après la mort de l'animal.
Passage de l'adrénaline en dilution 1 p. 100.000.

on a commencé l'expérience : le liquide circulait dans les vaisseaux de cette oreille sous une pression de 40 centimètres. Au début, la quantité de liquide sortant des veines de l'oreille oscilla, puis, pendant deux heures vingt minutes, le nombre de gouttes était de XXVIII-XXX en une minute. Alors on a fait pénétrer dans les vaisseaux de l'oreille une solution d'adrénaline de 1/100.000 dans le liquide de Ringer-Locke. Cinq minutes après l'introduction de l'adrénaline, il ne sortait que XXI gouttes, et vingt minutes après seulement VI gouttes. Ensuite, on a fait passer de nouveau le liquide de Ringer-Locke et la contraction des vaisseaux diminua assez rapidement : neuf minutes après la reprise du liquide de Ringer-Locke, le nombre

de gouttes fut de XXVI, puis il diminua jusqu'à XXIV, et il resta tel jusqu'à la fin de l'expérience, c'est-à-dire encore pendant trente-cinq minutes (voir la courbe 20).

Comme nous l'avons déjà dit, cette oreille avait été isolée d'un lapin mort d'une intoxication inconnue. Cela nous montre que les vaisseaux peuvent conserver la vie très longtemps après la mort de l'individu : la mort de l'organisme ne signifie donc pas la mort de tous les organes, ni de tous les tissus. Dans nos expériences ultérieures, nous avons observé les réactions vasculaires d'oreilles conservées pendant un mois et même soixante-dix jours. Krawkow, employant une technique spéciale, put constater des contractions de vaisseaux après le passage d'une solution d'adrénaline sur des oreilles conservées pendant cinq mois. Les vaisseaux de doigts humains conservés pendant vingt-trois, trente-huit et cinquante-trois jours réagissaient à l'adrénaline. Certains doigts, pendant le temps de conservation, montraient une température plus élevée de (1° - $1,5^{\circ}$) que la température du milieu de conservation. Krawkow a observé la croissance des ongles des doigts isolés et la sécrétion de la sueur après injection de la pilocarpine.

CONCLUSIONS.

Des expériences exposées dans le présent travail, on peut tirer les conclusions suivantes :

1° La méthode des vaisseaux isolés permet d'étudier les réactions vasculaires d'une manière simple et précise;

2° Les cultures microbiennes (microbe de Danysz et vibron cholérique chauffé) n'ont pas d'action prononcée sur les vaisseaux isolés;

3° La tuberculine provoque une contraction vasculaire;

4° Les toxines diphtérique, tétanique et œdématisienne provoquent une forte contraction des vaisseaux;

5° La méthode de vaisseaux isolés permet d'étudier le choc anaphylactique *in vitro*;

6° Le passage de l'antigène provoque une violente contraction des vaisseaux périphériques isolés des animaux sensibilisés;

7° Le passage des sérums antitoxiques de l'Institut Pasteur

ne provoque que de très faibles contractions vasculaires dans les organes d'animaux sensibilisés par les mêmes sérums;

8° Le sérum de cheval ne provoque pas de réaction des vaisseaux isolés des animaux non sensibilisés;

9° La sensibilité des vaisseaux isolés peut être contrôlée par l'adrénaline. Ils réagissent aux dilutions d'adrénaline de 1 p. 10.000.000.

10° La vie des vaisseaux peut être conservée pendant plusieurs jours après l'isolement de l'oreille (treize, dix-huit jours et plus);

11° La mort de l'organisme ne signifie pas la mort de tous les tissus.

(Institut Pasteur.)

SUR L'EXISTENCE ET SUR LA RÉPARTITION DE LA CAFÉINE ET DE LA THÉOBROMINE DANS LES ORGANES DU GUARANA (*PAULLINIA CUPANA* H. B. ET K.)

par MM. GABRIEL BERTRAND et P. DE BERREDO CARNEIRO.

Nous avons prouvé, à l'encontre des assertions de divers auteurs, que la pâte de guarana, préparée par des moyens primitifs ou industriels avec les graines de *Paullinia cupana*, renferme une proportion importante de caféine, sans théobromine, ni alcaloïde quelconque (1).

Nous avons tenu à contrôler ce résultat en examinant, non plus la pâte, mais les graines qui servent à sa préparation. En outre, sachant que les racines, les feuilles et les fleurs sont utilisées à peu près dans le même but par les indigènes, nous avons projeté de soumettre toutes les parties de la plante à une étude chimique comparative. Grâce au concours bienveillant du Ministère de l'Agriculture du Brésil, nous avons reçu tous les échantillons nécessaires à ces nouvelles recherches, dont nous publions ci-dessous les résultats.

GRAINES. — D'un poids moyen de 0 gr. 67, elles sont formées d'environ 83,5 p. 100 d'amande et de 16,5 p. 100 d'enveloppe.

Les amandes, seules employées pour la fabrication de la pâte, nous ont donné :

Eau (à + 105°)	11,02 p. 100
Matières grasses extraites par l'éther de pétrole et fusibles à + 23-24°).	2,68 —
Cendres	2,07 —
Caféine.	3,91 —

Les enveloppes ou téguments ont déjà été analysés : Peckolt y a trouvé 2,4 p. 100 de caféine (2), Tschirch et Grogg y ont signalé en outre de la théobromine (3).

(1) *Ann. Inst. Past.*, 48, 1932, p. 476.

(2) PECKOLT. *Sitz. Ber. d. kais. Akad. Wien.*, 54, 1866, p. 462.

(3) TSCHIRCH et GROGG. *Hand. der Pharmakognosie*, Leipzig, 1923, p. 442.

En opérant de la même manière que pour la pâte et les amandes, sur 20 grammes de matière sèche, nous avons dosé 2,29 p. 100 d'une substance ayant toutes les apparences de la caféine. Une extraction sur 300 grammes de téguments nous a fourni 6 gr. 6 de cette substance que nous avons soumise à un fractionnement par l'eau. L'expérience a montré qu'il s'agissait de caféine pure. L'affirmation de Tschirch et Grogg ne doit donc plus être retenue. Il n'y a dans les graines, amandes et téguments, que de la caféine sans théobromine. Nous n'y avons pas non plus rencontré d'alcaloïde proprement dit, à l'aide des méthodes que nous avons déjà utilisées pour l'examen de la pâte.

FEUILLES. — Comme les graines, ces organes ont déjà fait l'objet de quelques recherches. Peckolt n'y a pas reconnu de caféine, mais, à la place, une substance cristalline, inodore, fusible et volatile, qui n'a pas été autrement déterminée (1). Weevers, au contraire, a décelé, par des essais microchimiques, la présence de la caféine dans les feuilles jeunes, mais pas dans les feuilles âgées (2).

Il y a une part de vérité dans chacune de ces observations ; nous avons, en effet, réussi à extraire des feuilles une quantité assez importante de caféine et, beaucoup plus encore, d'une autre substance que nous avons identifiée avec la théobromine. Voici quelques détails sur la méthode dont nous nous sommes servis.

Un kilogramme de feuilles séchées et pulvérisées ont été épuisées méthodiquement, en trois fois, par 30 litres d'eau chauffée d'abord à $+ 50^{\circ}$. On a laissé macérer deux heures chaque fois et on a exprimé le liquide à la presse.

On a précipité les liquides réunis par le sous-acétate de plomb, enlevé le plomb resté dissous par l'acide sulfurique et concentré par distillation sous pression réduite dans un ballon de verre, jusqu'au volume d'un demi-litre environ. Il s'est fait un dépôt assez abondant que l'on a séparé par filtration. Ce dépôt contenait une partie des substances désignées plus haut avec un peu de sulfate de plomb et de sulfate de calcium. On l'a redissous dans l'eau bouillante, on a enlevé le plomb par

(1) PECKOLT. *Loc. cit.*

(2) WEEVERS. *Proceed. Sect. Sc. Konink. Akad. Wetenschap.*, Amsterdam, 29, 1929, p. 1048, et 32, 1929, p. 281.

l'hydrogène sulfuré, filtré et concentré. On a obtenu ainsi un second dépôt que l'on a épuisé par l'alcool bouillant. On a filtré pour éliminer le sulfate de calcium, et la solution alcoolique, évaporée à sec, a laissé 11 gr. 2 de substance organique, colorée en jaune rougeâtre.

Les eaux-mères aqueuses du premier et du second dépôt ont été réunies dans une ampoule à robinet de 2 litres et agitées un grand nombre de fois avec du chloroforme dont l'évaporation a fourni 5 gr. 3 de substance colorée en jaune. On a réuni les deux portions de substance organique et, après les avoir finement pulvérisées, on les a soumises à un fractionnement méthodique par l'eau distillée, à la température du laboratoire.

Pour ce fractionnement, on a employé 100 cent. cubes d'eau chaque fois et agité douze heures à l'aide d'une roue hydraulique. On laissait alors déposer, on prenait la température et on prélevait 20 cent. cubes du liquide décanté et filtré pour déterminer la solubilité et d'autres caractères de la substance dissoute. Enfin, on a évaporé à sec la masse principale de la solution que l'on remplaçait par les 100 nouveaux centimètres cubes d'eau distillée.

Nous avons séparé ainsi neuf fractions. Dès la septième, la solubilité était devenue constante, la substance obtenue par évaporation incolore et le point de fusion situé régulièrement à $+ 357-358^{\circ}$.

Les six premières fractions ont été de nouveau réunies pour être purifiées ensemble. On les a traitées par l'eau bouillante ; il s'est rassemblé un peu de matière huileuse ou résinoïde, que l'on a retenue avec un filtre mouillé ; la solution a été décolorée par du noir animal, filtrée, évaporée à sec, et le résidu repris par l'alcool absolu. Un peu de sulfate de calcium s'est encore séparé. La solution alcoolique a laissé déposer par concentration une très faible portion (0 gr. 02) d'un produit blanc, micro-cristallin, identique à la substance pure obtenue à partir de la septième fraction. Filtrée de nouveau et évaporée, elle a donné finalement un résidu de caféine presque pure, fondant à $+ 233-234^{\circ}$, et pesant 2 gr. 97.

D'un autre côté, les fractions 7, 8 et 9 ont été mélangées. On y a joint un reste de substance non dissoute, insuffisante pour saturer les 100 cent. cubes d'une dixième opération de fraction-

nement, et dont le point de fusion était identique à celui des principales fractions. Le tout pesait 12 gr. 03. C'était une substance blanche, cristallisée en aiguilles microscopiques, souvent groupées, de saveur amère. Elle était très peu soluble dans l'eau : 0,030 p. 100 à la température de 28°. A chaud, la solubilité était sensiblement plus grande.

De même que la caféine, cette substance commence à se sublimer déjà très nettement au-dessous de sa température de fusion qui, au bloc Maquenne, est située, comme celle de la théobromine pure retirée du cacao, à + 357-358° (1).

Elle donne la réaction colorée de la murexide et précipite, dans les mêmes conditions que sa proche parente, la caféine, avec les réactifs des alcaloïdes. C'est ainsi, en particulier, qu'elle donne avec l'acide silicotungstique, en présence d'acide chlorhydrique à 5 p. 100, un précipité microcristallin, jaune pâle, assez soluble à chaud, mais très peu soluble à froid (2).

Ce précipité, lavé à l'eau acidulée et séché à + 130° à poids constant, a fourni par calcination 82,80, et 82,90 p. 100 d'acides silicique et tungstique, ce qui correspond bien à un silicotungstate de théobromine de formule : $12 \text{ TuO}^2. \text{SiO}^2. 2\text{H}^2\text{O}. 3 \text{ C}^7\text{H}^5\text{N}^4\text{O}^2 + \text{H}^2\text{O}$ (calculé : 82,72 p. 100).

L'analyse élémentaire, par combustion en tube fermé, a d'ailleurs permis de doser dans la substance pure : pour le carbone, 47,30, 47,28, 46,83 et 46,62, au lieu de 46,6, calculé à partir de $\text{C}^7\text{H}^5\text{N}^4\text{O}^2$; pour l'hydrogène, 4,60, 4,55, 4,72 et 4,72, au lieu de 4,4, et pour l'azote (Dumas), 31,30 au lieu de 31,1.

Enfin, le dosage des groupes CH^3 par la méthode de Zeisel (3), modifiée par Herzig et Meyer (4), a donné comparativement (sur 0 gr. 1 de substance) : avec la caféine des feuilles, 22,8 p. 100, au lieu de 23,1, et avec la théobromine de même origine, 46,46, au lieu de 46,68.

D'après toutes ces expériences, les feuilles de *Paullinia cupana* renferment donc à la fois de la caféine et de la théobro-

(1) Ce point de fusion diffère notablement de celui qui est indiqué dans la littérature chimique.

(2) GAB. BERTRAND. Sur l'emploi de l'acide silicotungstique comme réactif des alcaloïdes. *Bull. Soc. Chim.* (3), 21, 1899, p. 434-39.

(3) ZEISEL. *Monatsh. f. Chem.*, 6, 1885, p. 989, et 7, 1886, p. 406.

(4) HERZIG et MEYER. *Monatsh. f. Chem.*, 15, 1894, p. 613; 16, 1895, p. 589, et 18, 1897, p. 379.

mine. Une extraction quantitative, sur 20 grammes de feuilles séchées et pulvérisées, a fourni un résidu chloroformique du poids de 0 gr. 316, d'où il a été possible de séparer, par différence de solubilité dans l'eau froide, 0 gr. 076 de caféine et 0 gr. 240 de théobromine, soit, pour 100 grammes de feuilles sèches, 0 gr. 38 de la première et 1 gr. 20 de la seconde.

RACINES. — Nous avons étudié séparément le cylindre central et l'écorce (1). Dans l'une et dans l'autre de ces parties, nous avons trouvé de la caféine, sans théobromine.

Les dosages ont donné :

Dans le cylindre total	0,27 p. 100 de caféine.
Dans l'écorce.	4,74 p. 100 de caféine.

TIGES. — Ici encore, nous avons analysé à part le bois et l'écorce (2). Dans le bois, il y avait seulement 0,19 p. 100 de caféine, mais dans l'écorce il existait, comme dans les feuilles, un mélange des deux composés xanthiques : 0,17 p. 100 de caféine et 0,98 p. 100 de théobromine.

INFLORESCENCES. — Enfin, nous avons examiné les inflorescences en traitant à part les fleurs et le pédoncule ramifié qui les porte. Dans les deux cas, nous avons trouvé de la théobromine et, pour ainsi dire, rien que de la théobromine.

Dans les fleurs	1,54 p. 100 de théobromine.
Dans le pédoncule	0,38 p. 100 de théobromine.

Il nous a paru seulement, par l'examen microscopique des cristaux obtenus du chloroforme, qu'il y avait des traces de caféine.

En résumé, le *Paullinia cupana* ou guarana renferme à la fois de la théobromine et de la caféine, très inégalement réparties dans ses divers organes.

Dans la feuille et dans l'écorce des tiges, il y a beaucoup de théobromine et une quantité notable de caféine.

Dans la fleur et dans le pédoncule ramifié de l'inflorescence, il y a beaucoup aussi de théobromine, mais seulement des traces de caféine.

(1) Cylindre central, 38,5 p. 100; écorce, 61,5 p. 100.

(2) Bois, 48 p. 100; écorce, 52 p. 100.

Dans la graine, dans le bois des tiges et dans la racine, il y a de la caféine, mais sans théobromine.

D'après les enseignements de la physiologie végétale, et les résultats que nous venons d'exposer, on est en droit d'admettre que la théobromine (ou diméthylxanthine) et la caféine (ou triméthylxanthine) prennent naissance dans les feuilles et dans les cellules chlorophyllées de l'écorce.

Dans les fleurs, le processus synthétique pourrait aussi se réaliser, mais le degré de méthylation de la xanthine ne dépasserait guère le terme théobromine.

Une fois formées, la théobromine et la caféine émigreraient vers les autres parties de la plante. Si, dans le bois de la tige, les racines et les graines, on ne trouve que de la caféine, c'est peut-être parce que la théobromine y subit une méthylation complète, ou parce que, beaucoup moins soluble, elle n'y arrive que difficilement. Il n'est d'ailleurs pas impossible que ces deux causes interviennent à la fois.

La présence d'une proportion importante de théobromine à côté de la caféine dans les feuilles de guarana mérite de fixer l'attention. Dans les feuilles de thé et de maté, dans celles du caféier, de l'*Ilex Cassine* Walt. et de *Neea theifera* Oerst, on n'a rencontré jusqu'ici que de la caféine. Tout au plus Krüger a-t-il réussi à extraire 0 gr. 9 de théobromine, en combinaison avec l'adénine, de 30 kilogrammes d'extrait de thé (1). Il y a donc une différence assez grande dans l'intensité des processus de méthylation de la xanthine entre les feuilles du guarana et celles des autres espèces de plantes à caféine.

En dehors de l'intérêt qu'ils présentent au point de vue de la physiologie végétale, ces résultats montrent que les feuilles de guarana doivent avoir sur l'organisme de l'homme une action différente de celle des graines, comme aussi des feuilles de thé et de maté. On pourrait peut-être utiliser les feuilles de guarana comme « aliment d'épargne » d'un type nouveau, ou bien encore s'en servir pour la préparation en grand de la théobromine.

(1) KRÜGER, *Zeits. f. Physiol. Chem.*, **16**, 1892, p. 160, et **21**, 1895, p. 274.